



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS

**Síntesis enzimática de neotrehalosa**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

PRESENTA

QFB. Anuar Said Martínez Galicia

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Agustín López Munguía

Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	24
<b>6.1. Expresión y purificación de la enzima AmyA y mutantes H222Q y F281G</b> 24	
6.1.1. Síntesis de neotrehalosa en las condiciones reportadas en la literatura. ....	26
<b>6.2. Estudio cinético de la síntesis de neotrehalosa empleando maltosa como     sustrato</b> .....	27
6.2.1. Digestión con glucoamilasa .....	30
<b>6.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de     neotrehalosa</b> .....	31
<b>6.4. Estudio de la producción de neotrehalosa a partir de maltosa y glucosa     como sustrato.</b> .....	33
<b>6.5. Estudio de reacciones de transglicosilación empleando p-nitrofenil-     glucopiranosido como sustrato.</b> .....	35
<b>6.6. Estudio de la síntesis de neotrehalosa a partir de almidón</b> .....	37
<b>6.7. Comparación de la producción de neotrehalosa con las mutantes de     AmyA H222Q y F281G</b> .....	39
<b>6.8. Efecto de la concentración de maltosa sobre almidón y viceversa sobre la     producción de neotrehalosa.</b> .....	39
<b>6.9. Síntesis de Lactoneotrehalosa a partir de lactosa y maltosa.</b> .....	42
<b>6.10. Síntesis de neotrehalosa a partir de maltosa en presencia de solventes.</b>	46
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	52
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	53

## 1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos siempre se han sentido atraídos por el sabor dulce característico de los azúcares; este atributo sensorial aunado a su amplia distribución en la naturaleza, contribuye a que los azúcares sean ejemplo clásico de los edulcorantes (**Garibay, et al., 2002**). Sin embargo existen otros azúcares que debido a sus propiedades químicas y físicas tienen diversas aplicaciones tecnológicas y son empleados en la industria alimenticia y farmacéutica.

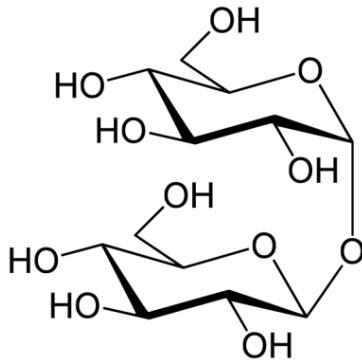
La trehalosa es un ejemplo de este tipo de azúcares. Se trata de un disacárido de glucosa no reductor que desde su descubrimiento se ha asociado a plantas y microorganismos resistentes a la sequía. En general se ha reconocido su papel protector de la actividad biológica (enzimas, vacunas, células, etc.), por lo que es empleado en muy diversas aplicaciones como estabilizante, como crioprotector en soluciones para la conservación de células madre o en el tratamiento de la xeroftalmia (resequedad de los ojos), entre otras.

La trehalosa cuenta con dos isómeros configuracionales, la isotrehalosa y la neotrehalosa, éste último muy poco abundante en la naturaleza. La neotrehalosa está formada por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glicosídico  $\alpha$ 1- $\beta$ 1; consecuencia de su baja disponibilidad se sabe muy poco de este isómero para el cual se han reportado propiedades similares a las de la trehalosa, tales como una baja digestibilidad, alta estabilidad química y un poder edulcorante similar a la sacarosa (**Aga, et al., 1997**). La estructura y algunas propiedades de la neotrehalosa se resumen en la Tabla 1.

---

**Tabla 1. Estructura y principales características de la neotrehalosa.**

---

 **$\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-Glucopiranosido**

- ❖ Disacárido no reductor
  - ❖ Estable a pH ácido y altas temperaturas (80°)
  - ❖ Poder edulcorante “efecto potenciador”
  - ❖ No higroscópico
  - ❖ Regulador de la presión osmótica
  - ❖ Excipiente: aumenta la viscosidad, previene la cristalización de otros azúcares
  - ❖ Alta solubilidad
  - ❖ no cariogénico
- 

Existen varias patentes en las cuales se protege el uso de la neotrehalosa de manera general como: agente de mejora de sabor, potenciador del poder edulcorante de otros azúcares y estabilizante en la formulación de productos farmacéuticos, los resultados de estos estudios demostraron que la neotrehalosa puede emplearse en aplicaciones similares a las de la trehalosa (**Shibuya, et al., 1996**).

Desafortunadamente no se ha dado continuidad a estas investigaciones, debido a que la obtención de neotrehalosa no es sencilla; en la naturaleza se encuentra a nivel de traza; la opción inmediata es la síntesis orgánica, sin embargo esta presenta dos inconvenientes principales, la complejidad estructural de la neotrehalosa, la cual requiere de un estricto control de la estéreo- y regio-especificidad de la reacción y los desechos altamente contaminantes empleados en este tipo de reacciones.

Por lo antes expuesto, para poder explotar su potencial resulta fundamental desarrollar un método eficiente para su síntesis, es decir, que reúna ciertas características, tales como alto rendimiento y una producción que además de sencilla sea económica. En este sentido la síntesis enzimática de azúcares se ofrecen grandes ventajas sobre la síntesis química como es el poder obtener

oligosacáridos a gran escala, gracias a que la regio- y estéreo- especificidad de las reacciones pueden ser controladas (**Crout, D.H. et al., 1998**). Adicionalmente, las condiciones suaves de reacción, implican por lo general un bajo consumo energético así como una generación menor de subproductos o residuos contaminantes, dando lugar a procesos sustentables.

Para el caso específico de síntesis de azúcares, existen numerosos reportes en los que se describe el uso de enzimas glicosidasas tanto en reacciones de hidrólisis inversa (síntesis controlada por el equilibrio), como de transglicosilación (control cinético), en los cuales se han obtenido buenos resultados (**Pierre et al., 1995**). Específicamente, la síntesis enzimática de neotrehalosa, se ha llevado a cabo empleando diferentes glicosidasas tales como glucoamilasas, ciclodextrina gluconotransferasas (CGTasas) y  $\alpha$ -amilasas (**Shibuya, et al., 1996**).

En este contexto, en una investigación reciente sobre reacciones de transglicosilación que se realizó en el laboratorio de biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, empleando  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* (AmyA) se encontró que bajo ciertas condiciones esta enzima es capaz de sintetizar neotrehalosa a partir de almidón o de maltooligosacáridos, pero también a partir de maltosa. Dada la relevancia potencial de la neotrehalosa, así como del hecho de que AmyA tome a la maltosa como sustrato (característica inusual de las  $\alpha$ -amilasas), resulta interesante explorar la capacidad y la eficiencia de AmyA para catalizar la síntesis de neotrehalosa, con el objetivo de plantear una ruta sintética eficiente, objetivo de este trabajo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Neotrehalosa

Neotrehalosa es el nombre común del compuesto  $\beta$ -Glucopiranosil-(1-1)- $\alpha$ -glucopiranososa. Se trata de un disacárido no reductor poco abundante en la naturaleza, el cual presenta ciertas ventajas tecnológicas, algunas de las cuales comparte con su isómero trehalosa, como ya se ha mencionado, tales como su gran estabilidad fisicoquímica, su solubilidad, su baja higroscopicidad, su poder edulcorante y el hecho de que pueda ser utilizado y asimilado como fuente de energía. Estas características hacen de la neotrehalosa una alternativa interesante para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Debido a su baja disponibilidad, no es posible pensar en la obtención de neotrehalosa a partir de un proceso de extracción de fuentes naturales, requiriéndose del desarrollo de un proceso de síntesis. En las siguientes secciones se presentan los antecedentes descritos en la literatura reportados hasta la fecha para este fin.

#### 2.1.1. Síntesis química

Desde su descubrimiento el siglo pasado (**Haworth, 1931**) y en trabajos posteriores (**Sharp, 1951**), el proceso de síntesis química se basa en la protección por acetilación de los grupos hidroxilo (2, 3, 4 y 6) de la glucosa para dirigir la reacción de condensación al hidroxilo de la posición 1, el único que no está protegido, para posteriormente desacetilar los compuestos obtenidos y así generar una mezcla de neotrehalosa, trehalosa e isotrehalosa. Este procedimiento presenta varias limitantes relacionadas con la necesidad de contar con un proceso de obtención fácil, de bajo riesgo y con rendimiento adecuado para hacerlo comercialmente viable. Fuera de este método, no existe otro reporte sobre síntesis química de la neotrehalosa.



### 2.1.2. Extracción de fuentes naturales

Existen dos fuentes naturales de neotrehalosa: la miel de abeja y los productos de la fermentación sólida del arroz. Dado que esta última constituye una vía microbiana de síntesis a partir de un sustrato amiláceo, es evidente que debe haber muchos otros productos fermentados en los cuales se sintetice neotrehalosa, aunque su presencia no se haya reportado hasta la fecha.

La miel es una solución sobresaturada de azúcares que contiene al menos 181 sustancias (**Swallow, K. W. et al., 1990**), dentro de las que se encuentran enzimas, aminoácidos, minerales, elementos traza, vitaminas, etc., Dentro de esta compleja mezcla se ha reportado la presencia de 15 disacáridos diferentes, siendo la neotrehalosa uno de ellos, y aunque su concentración varía en función del tipo de miel, en promedio representa menos del 0.1% p/p.

Por otro lado en 1959 se reportó la presencia de neotrehalosa, isomaltosa y kojibiosa en el extracto kojico, el cual se obtiene a partir de la fermentación sólida de arroz, en donde probablemente la neotrehalosa es generada por la maquinaria amilolítica de *Aspergillus awamori*, microorganismo predominante en dicha fermentación; a partir de este descubrimiento se propuso la extracción de neotrehalosa a partir del extracto kojico, sin embargo esta vía requeriría de grandes cantidades de materia prima, que además está destinada a propósitos principalmente en la industria alimenticia (**Matsuda et al., 1959**).

En conclusión, la obtención de neotrehalosa de fuentes naturales hasta este momento no es viable a pesar de existir algunos esfuerzos en esta dirección.

### 2.1.3. Síntesis enzimática

No es sino hasta principios de los años 90 del siglo pasado que se propone el uso de herramientas de la biocatálisis para la síntesis de neotrehalosa, siendo uno de los primeros acercamientos para la obtención de neotrehalosa el proceso de condensación de glucosa, empleando una glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Nikolov *et al.*, 1989). Posteriormente se propusieron métodos basados en reacciones de transglicosilación, en particular un método a partir de almidón o algún hidrolizado de éste como sustrato y una  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*, que cataliza reacciones de transglicosilación generando neotrehalosa, glucosa y oligosacáridos de glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4. Estos últimos son eliminados después de la reacción empleando una glucoamilasa de marca comercial "GLUCOZYME". En este proceso se obtiene un rendimiento del 15% con respecto al sustrato el cual se utilizó en concentraciones de entre 20 y 70 % p/v, requiriendo de tiempos de reacción muy largos, en promedio de 48 horas (Shibuya *et al.*, 1996). Paralelamente al trabajo de Shibuya *et al.*, se exploró el uso de otros sustratos y enzimas amilolíticas, dando como resultado la producción de oligosacáridos con núcleos de neotrehalosa; es el caso de la lactoneotrehalosa un trisacárido no reductor originado en una reacción en donde se empleó lactosa como grupo aceptor, CGTasa de *Bacillus stearothermophilus* y  $\alpha$ -ciclodextrina como donador de grupo glicosil. Cabe mencionar que esta molécula se puede hidrolizar para liberar neotrehalosa y galactosa empleando una  $\beta$ -galactosidasa (Miwa *et al.*, 1995). Estos trabajos demuestran que una alternativa interesante y viable para la síntesis de neotrehalosa es la de aprovechar la capacidad transglicosídica de las enzimas glicosil-hidrolasas.

2.1.3.1. Enzimas glicosil-hidrolasas

Las glicosil-hidrolasas (GH) o glicosidasas (E.C. 3.2.1.\_) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos azúcares o entre un azúcar unido a otra molécula aglicona, tal como se muestra en la Figura 1 (Davies *et al.*, 1995). De acuerdo con su especificidad, estas enzimas pueden actuar sobre polisacáridos en forma endo u exo dependiendo de su especificidad:

- exo: cortan los enlaces glicosídicos extremos de cadenas de polisacáridos, liberando mono, di u oligosacáridos del extremo no reductor.
- endo: cortan los enlaces glicosídicos internos al azar (van der Maarel *et al.*, 2002).

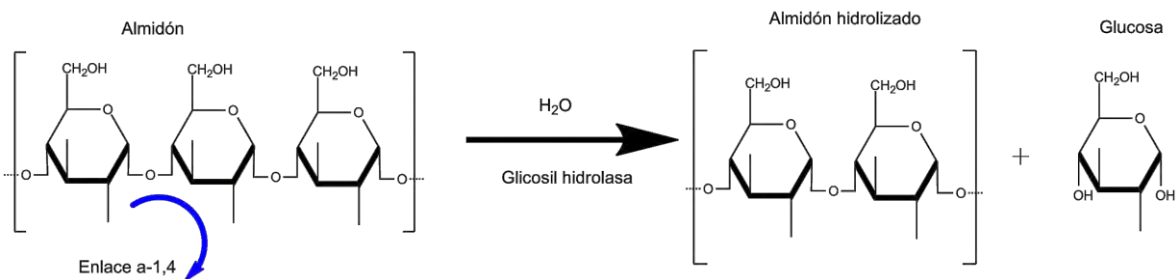


Figura 1. Hidrólisis de almidón catalizada por una enzima glicosil hidrolasa (a) Exo y (b) Endo.

De acuerdo con la forma en que las GH hidrolizan el enlace glicosídico de su sustrato, se clasifican en dos tipos: aquellas que hidrolizan al sustrato invirtiendo la configuración del carbono anomérico que participa en el enlace y aquellas que lo hidrolizan reteniéndolo.

La hidrólisis del enlace se lleva a cabo mediante una catálisis general ácida, la que requiere de la participación de dos residuos, uno que actúa como donador de un protón (ácido) y otro que actúa como nucleófilo/base, como se ilustra en la Figura 2 (Sinnott, 1990).

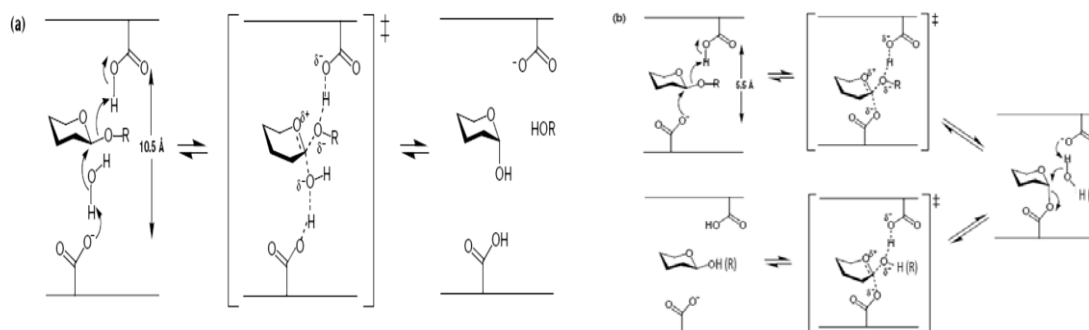


Figura 2. Hidrólisis de glicósidos. (a) Inversión de la configuración anomérica (b) retención de la configuración anomérica. R=H: Cuando el aceptor es agua “hidrólisis”. R: Cuando el aceptor es diferente al agua “transglicosilación” (Ryeet *al.*, 2000).

### 2.1.3.2. $\alpha$ -amilasas

La familia de las alfa amilasas corresponde a la familia 13 de las glicosilhidrolasas, de acuerdo a la clasificación de Henrissat (1991), basada en la homología de secuencia de aminoácidos, clasificación que en principio facilita recabar información acerca de la función y estructura de estas enzimas. La familia 13 incluye enzimas que tienen las siguientes características: (i) actúan sobre enlaces  $\alpha$ -glicosídicos e hidrolizan estos enlaces para producir mono- u oligosacáridos  $\alpha$ -anoméricos (hidrólisis), forman enlaces glicosídicos  $\alpha$ ,1-4 o 1-6 (transglicosilación) o una combinación de estas dos actividades; (ii) poseen un dominio catalítico con una estructura  $(\beta/\alpha)_8$  (Mac Gregor *et al.*, 2001) o barril TIM (Figura 3), en las asas del cual se encuentran los residuos catalíticos, (Sugio *et al.*, 1994); (iii) tienen cuatro regiones conservadas en su estructura primaria.

De manera más específica las  $\alpha$ -amilasas están constituidas por 3 dominios denominados A, B y C; El dominio A es el dominio central y es el que presenta la actividad catalítica, es el más conservado ya que se encuentra en todas las  $\alpha$ -amilasas, y consiste en una estructura simétrica de ocho láminas- $\beta$  paralelas arregladas en forma de barril, rodeadas por ocho  $\alpha$ -hélices. El dominio B se forma por una extensión de la tercera lámina  $\beta$  y la tercera  $\alpha$ -hélice del barril (dominio A) y su secuencia es muy variable entre las  $\alpha$ -amilasas. Finalmente, el dominio C es un dominio que posee un motivo con forma de llave griega, constituye la parte carboxilo terminal de la proteína y se le adjudica como función la unión al almidón (Davies *et al.*, 1995).

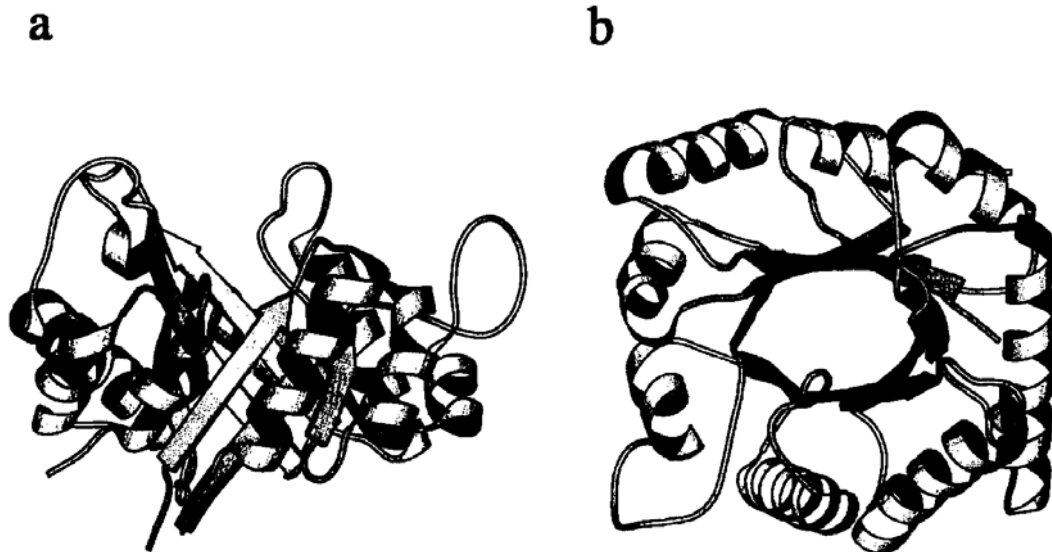


Figura 3. Estructura de una proteína  $\alpha$ -amilasa, detalle del barril TIM, . (a) Vista lateral, la región C terminal del barril- $\beta$  está orientada hacia arriba de la página. (b) Vista superior, la región C terminal del barril- $\beta$  está orientada hacia el lector. (Janecek, 1997)

### 2.1.3.3. $\alpha$ -amilasa de *T. marítima* (AmyA)

La bacteria hipertermófila *T. marítima* fue aislada de sedimentos marinos geotérmicos en Vulcano Italia, siendo capaz de emplear diferentes carbohidratos como fuentes de carbono. Dentro de las enzimas amilolíticas encontradas en esta bacteria, la  $\alpha$ -amilasa de *T. marítima* (**AmyA**) es una enzima extracelular, clasificada dentro de las  $\alpha$ -1,4-D-glucanhidrolasas, (E.C. 3.2.1.1) de la familia 13 de las glicosil-hidrolasas, por lo que cataliza reacciones de hidrólisis de enlaces internos  $\alpha$ -1,4 de almidón, empleando el mecanismo de retención de configuración anomérica (**Schumann et al., 1991**).

2.1.3.3.1. Propiedades de AmyA

Las propiedades de AmyA fueron reportadas por **Lieble *et al.*, (1997)**. En este estudio el gen de la  $\alpha$ -amilasa fue expresado en *E. coli*, y la enzima fue purificada para su caracterización. La masa molecular de la enzima recombinante fue estimada cercana a los 61 kDa por la técnica de electroforesis desnaturizante SDA-PAGE, y 63 kDa por cromatografía de permeación en gel. Las condiciones óptimas de actividad de AmyA son pH 7.0 en un rango de temperatura de entre 85 y 90°C (Lieble *et al.*). La actividad de esta enzima es dependiente del ion  $Ca^{2+}$ , semejante a las  $\alpha$ -amilasas de otros microorganismos. Los productos finales de la hidrólisis de almidón y amilosa son principalmente glucosa y maltosa. Algunas de las propiedades de la enzima se muestran en la Figura 4.

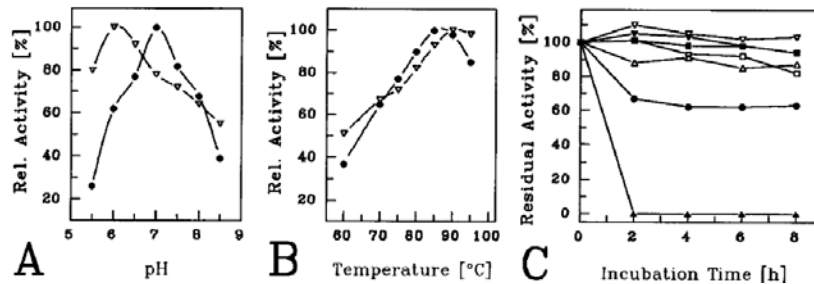


Figura 4. Efecto del pH y la temperatura en la actividad y estabilidad de AmyA. (Liebl, *et al.*, 1997) (A) Efecto del pH sobre la hidrólisis de amilosa. (▼)Extracto crudo T.maritima;(●) AmyA recombinante. (B) Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de amilosa. (▼)Extracto crudo T. maritima;(●) AmyA recombinante. (C) Estabilidad térmica en ausencia (●) o en presencia de varios aditivos (▼, 0.01% Tritón; ▽,15% betaina; ■,38% sorbitol; △,50% glicerol; 40µg de albumina sérica bovina por mL; ▲,10mM  $CaCl_2$ ).

#### 2.1.3.3.2. Estudios de transglicosilación

AmyA es una enzima sacarificante que cataliza la hidrólisis de enlaces intramoleculares  $\alpha$ -1,4 de polímeros de glucosa, para generar productos de bajo peso molecular (G1-G7); sin embargo a largos tiempos de reacción es capaz de producir exclusivamente glucosa y maltosa. En estudios realizados en nuestro grupo (**Moreno et al., 2009**), se demostró que AmyA es capaz de transformar maltosa en oligosacáridos tales como la maltopentaosa, a través de una combinación de reacciones de transferencia e hidrólisis. Adicionalmente, se identificó a la neotrehalosa como uno de los productos originados por la actividad transglicosídica.

#### 2.1.3.3.3. Reacciones de alcoholisis por AmyA

Como ya se mencionó, las  $\alpha$ -amilasas son enzimas capaces de catalizar reacciones de transglicosilación, siendo la alcoholisis un caso particular de las reacciones de transglicosilación, en la cual el grupo aceptor del glicosilo es un alcohol. El objetivo del trabajo realizado por Moreno et al; estaba enfocado en la síntesis de alquil-glicósidos mediada por AmyA, dado el interés de sintetizar compuestos con las características surfactantes de los alquil glucósidos.

En la caracterización de las reacciones de transglicosilación y alcoholisis realizadas por AmyA, estos autores observaron también la capacidad de la enzima para emplear oligosacáridos de bajo peso molecular (G2-G7) como sustrato. Reportaron que cuando se emplea almidón al 6% como sustrato, la enzima genera maltosa (en mayor medida), glucosa y maltotriosa como productos mayoritarios, además de otros oligosacáridos de bajo peso molecular (G4-G8) en menor cantidad. Al adicionar concentraciones de metanol que van de 20 a 40%, observaron la formación de metil-glucósido resultado de la transferencia de los productos hidrolizados por la enzima al alcohol. Una forma de cuantificar la alcoholisis en este tipo de reacciones consiste en medir la cantidad total de



metilglucósido después de hidrólisis con glucoamilasa de todos los productos de transglucosilación. Así se demostró que la enzima es capaz de producir una cantidad de metil-glicósido de 7.5 mg/ml, muy superior a la encontrada con *A. niger* en condiciones óptimas de la reacción, que era de 2.32 mg/ml (Fig. 5).

$\alpha$ -amilasa	Metil-glicósido (mg/mL)
<i>A. niger</i>	2.32
<i>A. oryzae</i>	0.76
<i>T. maritima</i>	7.5

Figura 5. Caracterización de reacciones de alcoholisis catalizadas por diferentes  $\alpha$ -amilasas en términos de la cantidad de metil-glicósido obtenido después de hidrólisis con glucoamilasa de los productos de alcoholisis. (Santamaría *et al.*, 1999; Damián-Almazo *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2010).

En ese mismo estudio, se observó y reportó la síntesis de neotrehalosa, como parte de los subproductos de la reacción de alcoholisis. En particular, se estudiaron reacciones de alcoholisis llevadas a cabo con AmyA, empleando maltosa como donador de glucosilos y metanol como aceptor, dando como resultado la formación de glucosa, metil-glicósido y oligosacáridos, como se esquematiza en la Figura 6, además del disacárido neotrehalosa cuya estructura los autores desconocían al inicio del proyecto.

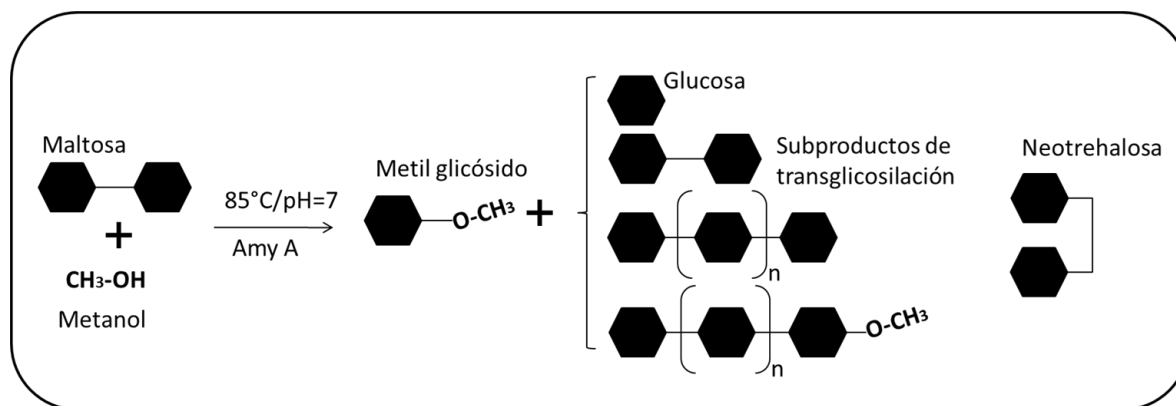


Figura 6. Productos de la reacción de alcoholisis por AmyA empleando maltosa y metanol como sustratos.

Al estudiar los productos generados en la reacción descrita en la Fig. 6, después de la eliminación de los malto-oligosacáridos mediante hidrólisis mediada por una glucoamilasa de *A. niger* (Figura 7) se puso de manifiesto por un lado, la capacidad de AmyA para producir metil glucósidos a partir de maltosa y metanol; al mismo tiempo se observó la generación de los productos típicos de transglicosilación y la presencia de un disacárido no reductor el cual más tarde se identificó estructuralmente como neotrehalosa, mediante análisis de espectro NMR. La identificación inicial de los productos mediante TLC se ilustra en la Figura 8, (Moreno *et al.*, 2009).

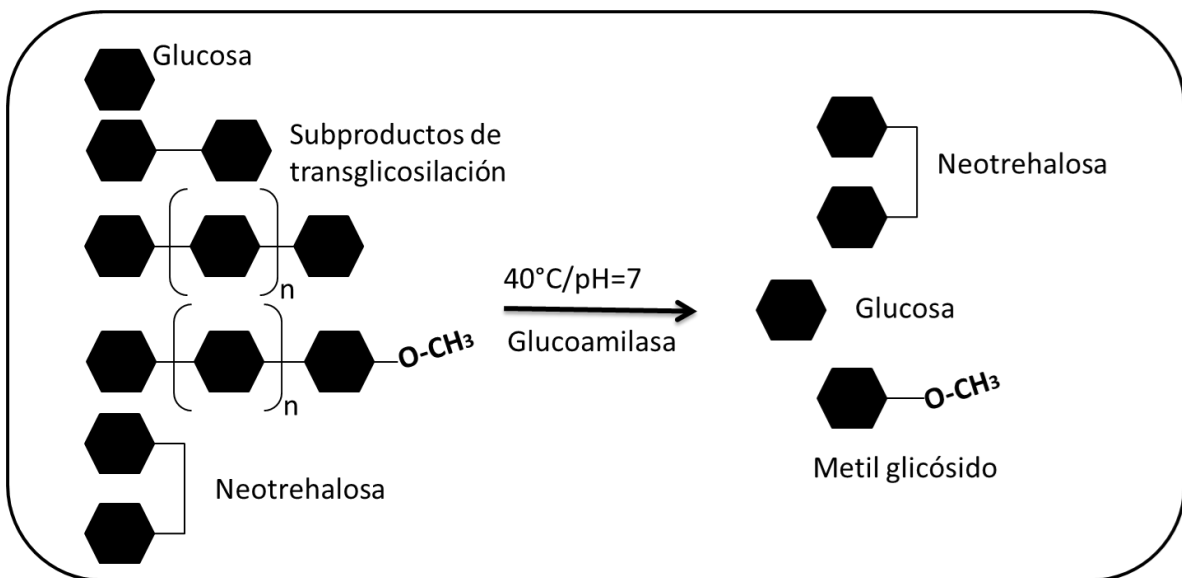


Figura 7. Hidrólisis con glucoamilasa de los subproductos de la reacción de alcoholisis de maltosa y metanol con AmyA.

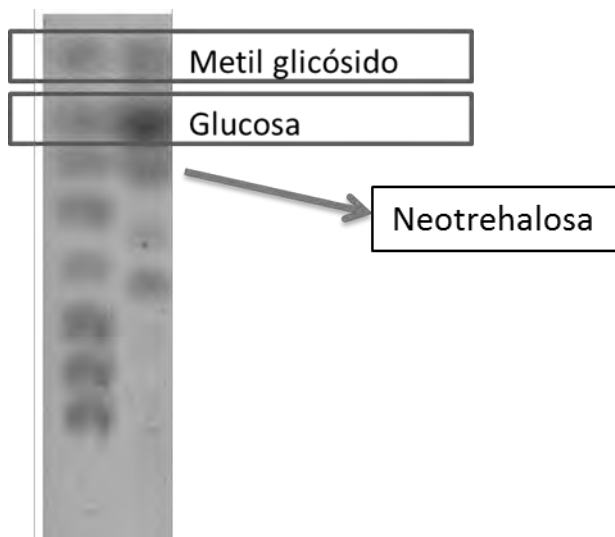


Figura 8. Determinación de la presencia de neotrehalosa como un producto de reacciones de transglicosilación por AmyA. (1) reacción de alcoholólisis empleando maltosa y metanol como sustratos. (2) hidrólisis de los subproductos de la reacción de alcoholólisis empleando una glucoamilasa de *A. niger*. Aislamiento del disacárido e identificación estructural mediante RMN.

El trabajo realizado por Moreno y col. representa una alternativa importante para la síntesis de neotrehalosa, ya que la enzima amilolítica de *T. marítima* (AmyA) presenta ciertas ventajas sobre otras enzimas por ser termófila, altamente transglicosídica y por el hecho de que esta enzima puede producir neotrehalosa a partir de maltosa.

#### 2.1.3.3.4. Mutagénesis sitio dirigida para aumentar la actividad alcoholítica

En un estudio subsecuente (**Almazo et al., 2008**), se aplicaron estrategias de ingeniería de proteínas para mejorar la capacidad transferasa de AmyA, estrategias que han resultado exitosas en otras amilasas para mejorar la transferencia en general y la alcoholólisis en particular. En concreto, se llevó a cabo una mutación sitio-dirigida de AmyA en el residuo Histidina 222 por una glutamina, mejorando el rendimiento de la síntesis de alquilglicósido como consecuencia del aumento de la relación alcoholólisis/hidrólisis.

La síntesis de neotrehalosa resulta relevante tanto por su posible utilidad tecnológica, como por la información básica derivada del mecanismo de formación de este tipo de enlaces mediante enzimas amilolíticas, ya que se sabe muy poco al respecto de esta actividad lateral de las amilasas. En este sentido, las investigaciones realizadas por Shibuya y su grupo marcan un primer aporte en esta dirección, al reportar algunas enzimas del tipo glicosil-hidrolasas con capacidad de generar neotrehalosa, AmyA es un ejemplo adicional de amilasas con esta propiedad, por lo que resulta interesante investigar el mecanismo de síntesis, y en función de éste, plantear una metodología racional para la obtención eficiente de neotrehalosa.

### **3. HIPOTESIS**

Como consecuencia del estudio del conjunto de variables que afectan la especificidad de AmyA y de los sustratos que emplea, será posible definir condiciones que permitan una síntesis más eficiente de neotrehalosa.

## 4. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Diseñar un método enzimático para la síntesis eficiente de neotrehalosa empleando la enzima AmyA.

### **Objetivos particulares**

Estudiar la cinética de la síntesis de neotrehalosa empleando diferentes sustratos, el efecto de estos sobre la producción de neotrehalosa y el perfil de productos adicionales.

Establecer las condiciones de reacción más adecuadas para obtener un mayor rendimiento, definiendo el sustrato más adecuado para la reacción.

.

Determinar si mutantes de AmyA con mayor actividad alcoholítica tiene un efecto en la síntesis de neotrehalosa.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Obtención de la $\alpha$ -amilasa de *T. marítima* (AmyA) silvestre y mutantes H222Q y F281G.

Transformación en *E. coli* XL1Blue por electroporación.

Se tomaron 2  $\mu$ l de cada plásmido (AmyA silvestre/mutante) resuspendidos en agua y se mezclaron con una alícuota de 50  $\mu$ l de células competentes de *E. coli* XL1Blue previamente descongeladas. La electroporación se llevó a cabo con un pulso de 1.8 Volts, recuperando las células en 1 ml de medio compuesto por 980  $\mu$ l de SOC, 10  $\mu$ l de glucosa 2 M, 10  $\mu$ l de MgCl-MgSO<sub>4</sub> 1 M, y se incubaron en agitación a 37 °C por 1 hora. Los cultivos se plaquearon en cajas con medio LB/ampicilina y se incubaron a 37 °C por 12 horas.

#### 5.1.1. Producción de la enzima AmyA

La producción de AmyA se realizó mediante procesos de fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL inoculando con 3 colonias obtenidas en el paso anterior en 100ml de medio LB e incubando durante 18 h, a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente se inoculó con 20 mL de la fermentación anterior un litro de medio LB-ampicilina 200  $\mu$ g/mL que se mantuvo en incubación a 30 °C hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub>= 0.4-0.5, momento en el que se indujo la expresión de la enzima agregando IPTG a una concentración final en el matraz de 0.25 mM, manteniendo el cultivo con agitación constante a 21 °C por un mínimo de 8 horas adicionales. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 7500 rpm durante 20 minutos a 4°C, después se lavaron tres veces y se resuspendieron en 6 ml amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7. La lisis de las células se efectuó mediante sonicación por 30 segundos con períodos de reposo de 3 min, en ciclos repetidos 10 veces. Posteriormente el extracto enzimático se

recuperó separando los restos celulares por centrifugación a 10,000 rpm por 30 min a 4°C. Aprovechando la termoestabilidad de AmyA, se aplicó al extracto enzimático un tratamiento térmico a 82°C en agitación por 30 minutos, para precipitar proteínas termo-sensibles, el precipitado formado fue removido por centrifugación a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró usando acrodiscos de 0.2 µm (PallCorporation).

#### 5.1.2. Purificación de AmyA mediante cromatografía de afinidad.

La purificación de AmyA una vez extraída de las células y parcialmente purificada mediante termocoagulación, se efectuó mediante cromatografía de afinidad a níquel, utilizando una columna de con capacidad de 1 ml (HiTrapChelating HP, Amersham biosciences) de acuerdo a las especificaciones reportadas por el fabricante. El imidazol empleado para eluir la enzima fue removido por diafiltración empleando filtros moleculares Amicon Ultra-15, con un corte molecular de 10 kDa. El análisis de la purificación se realizó por electroforesis SDS-PAGE. La proteína se determinó en cada una de las etapas empleando el método de Bradford, (Bradford, 1976).

#### 5.1.3. Actividad enzimática

La actividad de AmyA se determinó midiendo los azúcares reductores de acuerdo al método reportado por **(Miller, 1959)** en el cual se emplea almidón al 1% (p/v) y DNS como reactivo indicador, las reacciones se llevaron a cabo con agitación, en condiciones controladas de temperatura y pH. La temperatura y la agitación se controlaron por medio de termomixer Eppendorf confort 1.5 mL; el pH se estableció por medio del buffer BIS–TRIS–HCl, 50mM, 2mM CaCl<sub>2</sub> y 150mM NaCl, pH=7.



**5.2.** Estudio de la síntesis de neotrehalosa empleando maltosa como sustrato.

Se estudió la producción de neotrehalosa a partir de concentraciones crecientes de maltosa 20, 40, 60, 100, 150 y 300 g/L, incubadas en presencia de AmyA (10U/mL). Las muestras fueron tomadas a tiempos finales de reacción, y los datos corresponden a los productos finales, cuando estos ya no variaban en el tiempo. En otros experimentos, AmyA se incubó a una concentración de 10 U/mL, con una concentración de maltosa del 60 g/L, en reacciones que fueron monitoreadas durante 48 horas, tiempo durante el cual se tomaron muestras con la frecuencia necesaria para describir adecuadamente el fenómeno.

**5.3.** Estudio de la producción de neotrehalosa a partir de la combinación de almidón, maltosa y glucosa como sustratos.

Se estudió la producción de neotrehalosa a partir de maltosa y glucosa, a una concentración de 60 g/L para ambos sustratos. La reacción se incubó en presencia de AmyA (10U/mL) y fue monitoreada por 24h. En otros experimentos AmyA se incubó a la misma concentración en presencia de almidón (100g/L). Las reacciones se monitorearon a tiempos lo suficientemente cortos para obtener información de los primeros momentos de la reacción y a tiempos prolongados para asegurar que se había llegado al final de la reacción.

Se realizó un estudio mediante un diseño de experimentos  $2^2$  en el cual se evaluaron los sustratos maltosa y almidón a dos niveles de concentración: 50 y 100 g/L. las combinaciones de tratamientos fueron las siguientes: Nivel bajo= 50g/L, nivel alto= 100g/L, empleando las siguientes combinaciones:

- a) Maltosa bajo, almidón bajo
- b) Maltosa alto, almidón bajo
- c) Maltosa bajo, almidón alto
- d) Maltosa alto, almidón alto

Las muestras se tomaron al inicio de la reacción (tiempo cero) y a las 24h.

#### **5.4. Estudio de reacciones de transglicosilación empleando p-nitrofenil-glucopiranosido(PNFG) como sustrato**

Con el fin de explorar la especificidad de la enzima se analizó también la actividad de la enzima sobre p-nitrofenil-glucopiranosido a una concentración de 1% p/v. Se tomaron muestras al inicio de la reacción y cada hora durante las primeras 3 horas y posteriormente a las 18 y 24 horas.

El p-nitrofenol liberado por la reacción con AmyA fue cuantificado por vía espectrofotométrica empleando el lector de microplaca a una longitud de onda de 410nm.

#### **5.5. Comparación de la producción de neotrehalosa por diferentes mutantes de AmyA.**

Los plásmidos para producir las enzimas mutantes HQ y FG fueron amablemente proporcionados por la Dra. Gloria Saab Rincon. La síntesis de neotrehalosa por las dos mutantes evaluadas se realizó empleando las siguientes condiciones: maltosa 100 g/L; 10U/mL de AmyA silvestre o mutante según sea el caso, tiempo de reacción 24h.

### 5.6. Cuantificación de los productos por (HPAE)

La neotrehalosa así como los demás productos de la reacción se cuantificaron por (HPAE) HP anion-exchange chromatography (Dionex, Sunnyvale, USA), en cuyo caso la separación de los productos de reacción fue lograda empleando el siguiente gradiente: eluente A (0 min, 100%); (15min, 50%); (20 min, 60%); El eluente A consta de una solución normalizada de 150mM de NaOH y el eluente B 0.5M acetato de sodio/150mM NaOH.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Expresión y purificación de la enzima AmyA y mutantes H222Q y F281G

Las enzimas fueron producidas y purificadas como se especifica en la sección de materiales y métodos. En la figura 9 se muestra un gel de electroforesis SDS-PAGE, donde se observan buenos niveles de expresión de AmyA, así como el nivel de pureza alcanzado después de la cromatografía de afinidad. .

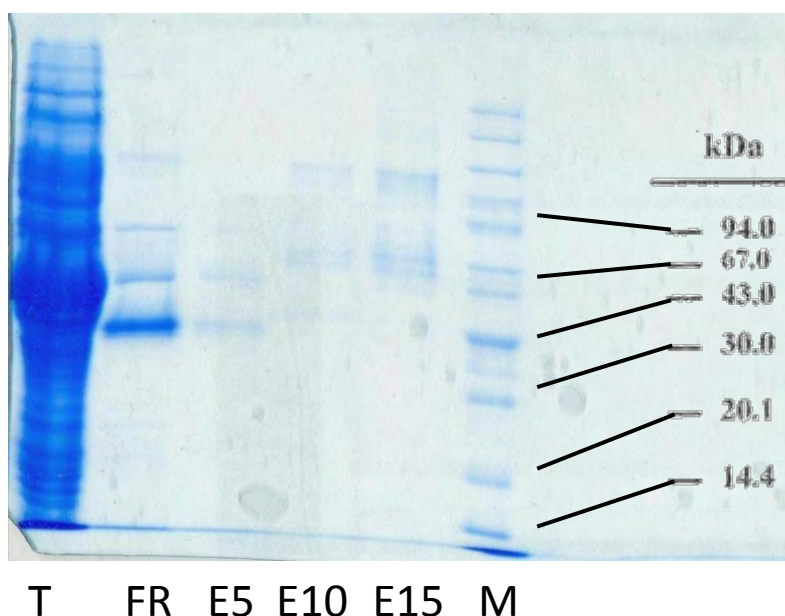


Figura 9. Gel de SDS-PAGE del proceso de purificación de AmyA.

T= Extracto del cultivo de *E. coli*; FR= no retenido en la columna, E5, E10 y E15 = fracciones con 5, 10 y 15 % de imidazol respectivamente, colectadas de la cromatografía de afinidad a níquel, M=Marcador de peso molecular.

En la figura 10 se muestran los resultados del proceso de purificación aplicado a las dos enzimas mutantes de AmyA (H222Q y F281G) expresadas en *E. coli*, las cuales presentaron buenos niveles de expresión (carriles 1 y 2). En los carriles 5 y 6 se muestran las enzimas mutantes y en el 6 la silvestre después de purificarlas por afinidad a níquel, y en la tabla 2 se reportan las actividades específicas obtenidas. Cabe mencionar que la actividad de las mutantes H222Q y F281G concuerda con los resultados reportados en la literatura, (Almazo, *et al.*, 2008).

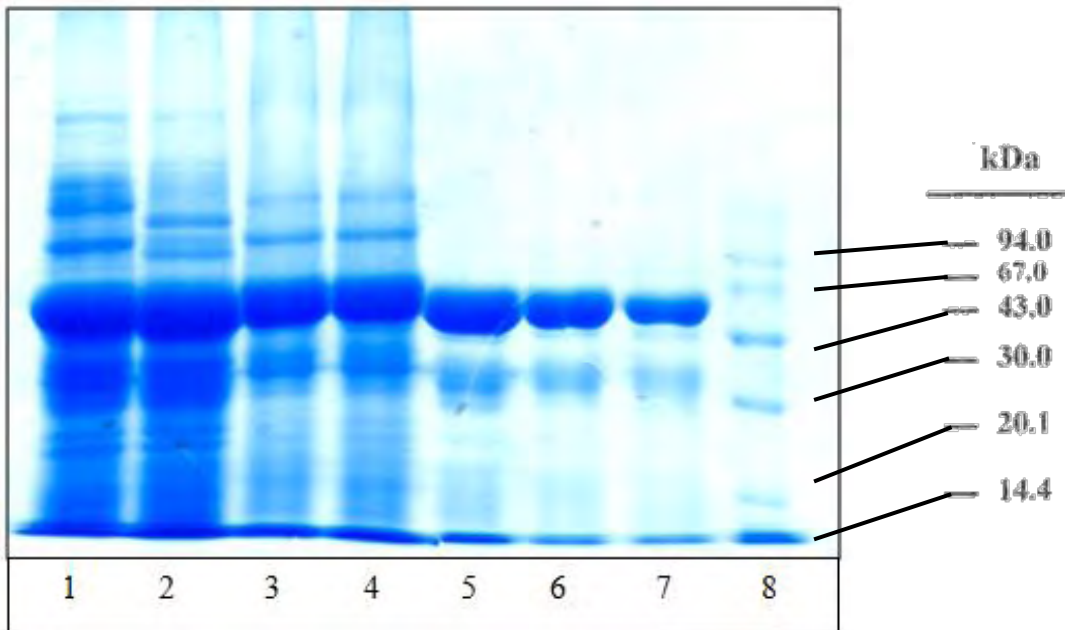


Figura 10. Gel SDS-PAGE del proceso de purificación de mutantes de AmyA. Extracto celular de los cultivos de *E. coli* mutantes H222Q (carril 1) y F281G (carril 2); Extracto después de tratamiento térmico: H222Q (carril 3) F281G (carril 4). Muestras después de la cromatografía de afinidad H222Q, (carril 5), F281G (carril 6) y AmyA silvestre (carril 7); Marcadores de peso molecular (carril 8)

Tabla 2. Actividad específica de AmyA silvestre y mutantes medida sobre almidón al 1% p/v, 85°C y pH=7, después del proceso de purificación.

Enzima	Actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ )
AmyA Wt	1634.3
H222Q	631.1
F281G	355.6

### 6.1.1. Síntesis de neotrehalosa en las condiciones reportadas en la literatura.

Con el fin de reproducir los resultados reportados por Moreno y col (2009), se realizaron ensayos manteniendo las condiciones reportadas, mismas que se describen en la tabla 3. En estos experimentos se reprodujo adecuadamente el perfil de productos reportado con anterioridad, con una concentración final de neotrehalosa de 6 g/L, equivalente a un rendimiento de producción de neotrehalosa de 10% con respecto a la maltosa inicial, que se agregó a razón de 60 g/L (figura 11).

**Tabla 3. Condiciones reportadas para la producción de neotrehalosa empleando AmyA y maltosa como sustrato.**

Síntesis de neotrehalosa	
Temperatura	85°C
Enzima	10U/mL pH=7, 85°C
Concentración de Maltosa	60g/L
Tiempo de reacción	48 horas
Tratamiento con glucoamilasa	Glucoamilasa de <i>A. niger</i> 40 U/mL, 40°C, pH=4 y un tiempo de 5 horas

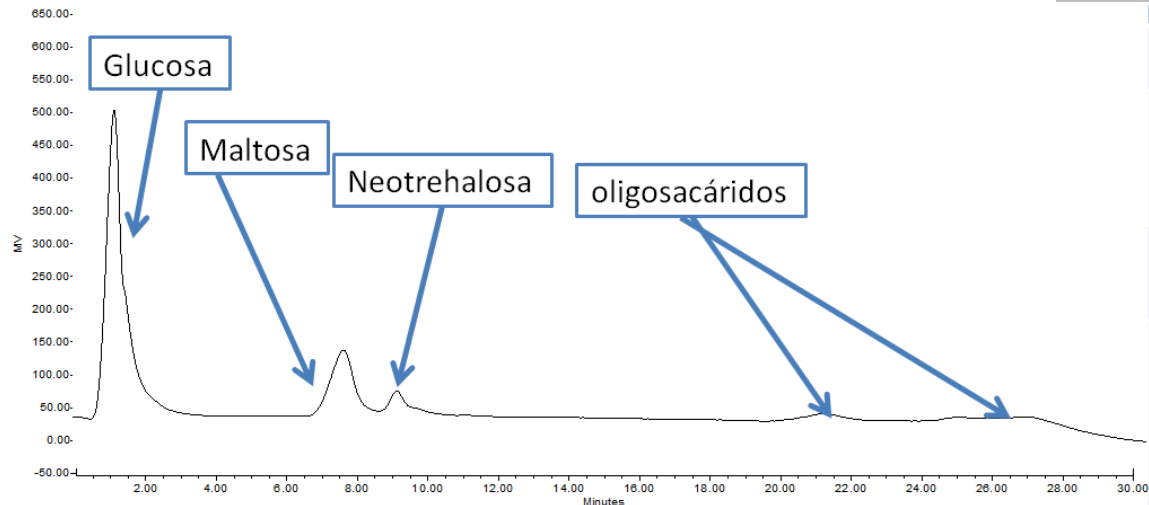


Figura 11. Cromatograma de HPLC donde se muestran los productos de reacción de AmyA (10U/mL) obtenidos cuando se emplea maltosa como sustrato a una concentración de 60g/L después de 24h.

## 6.2. Estudio cinético de la síntesis de neotrehalosa empleando maltosa como sustrato

Con el fin de analizar cómo evoluciona la síntesis de neotrehalosa en función del tiempo, se estudió la reacción en las condiciones descritas en materiales y métodos. La evolución de la reacción se muestra en la figura 12, en la que se observa que la producción de neotrehalosa, así como el consumo de maltosa y aparición de glucosa sucede fundamentalmente durante las primeras 7 horas de reacción; Posteriormente, ya no se observan cambios importantes a pesar de que la maltosa no se ha consumido totalmente.

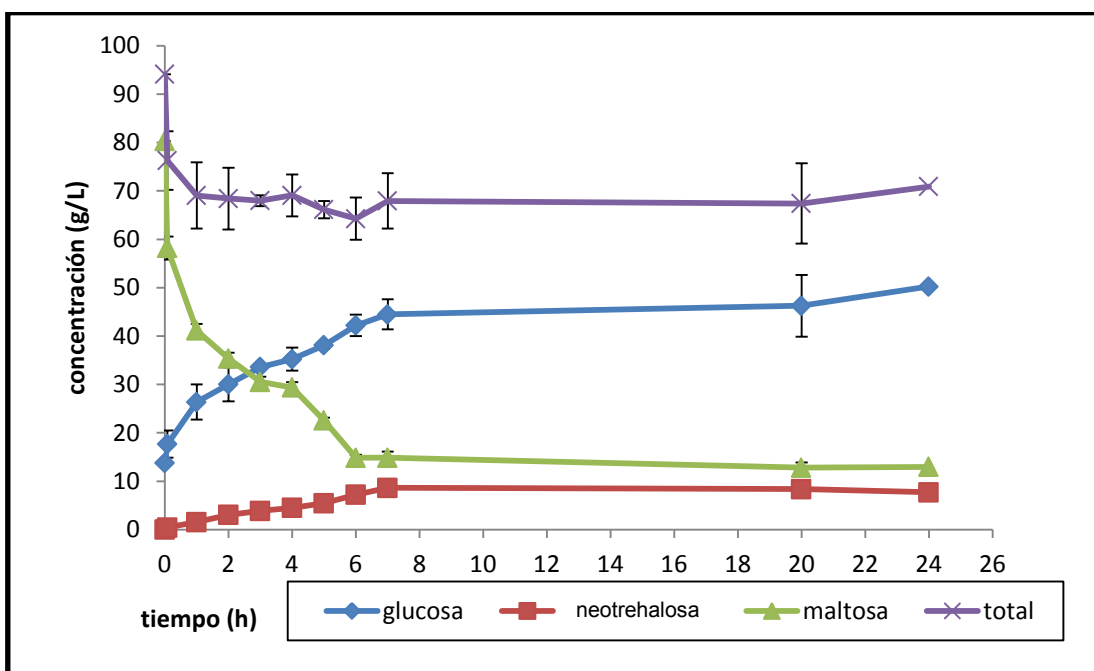


Figura 12. Evolución de la reacción de síntesis de neotrehalosa a partir de maltosa 100g/L, pH=7, T=85°C y en presencia de 10U/mL de AmyA.

Como puede observarse en la figura 12, después de un cierto tiempo de reacción y a pesar de que aun existe una importante cantidad de sustrato, las concentraciones de glucosa, maltosa y neotrehalosa se mantienen constantes, lo que podría considerarse como el equilibrio de la reacción. Con el fin de demostrar que este fenómeno no se debía a la inactivación de la enzima se realizó una reacción en las mismas condiciones del estudio anterior, solo que después de 24 horas de reacción se adicionaron otras 10 U/ml de enzima, incubando la reacción durante 8 horas más. En la figura 13 se observa que después de la segunda adición de enzima no hay cambio en el consumo de maltosa, ni en la aparición de glucosa o neotrehalosa, por lo que se concluye que la estabilidad de la enzima no es la causa de que la maltosa no se consuma en su totalidad.



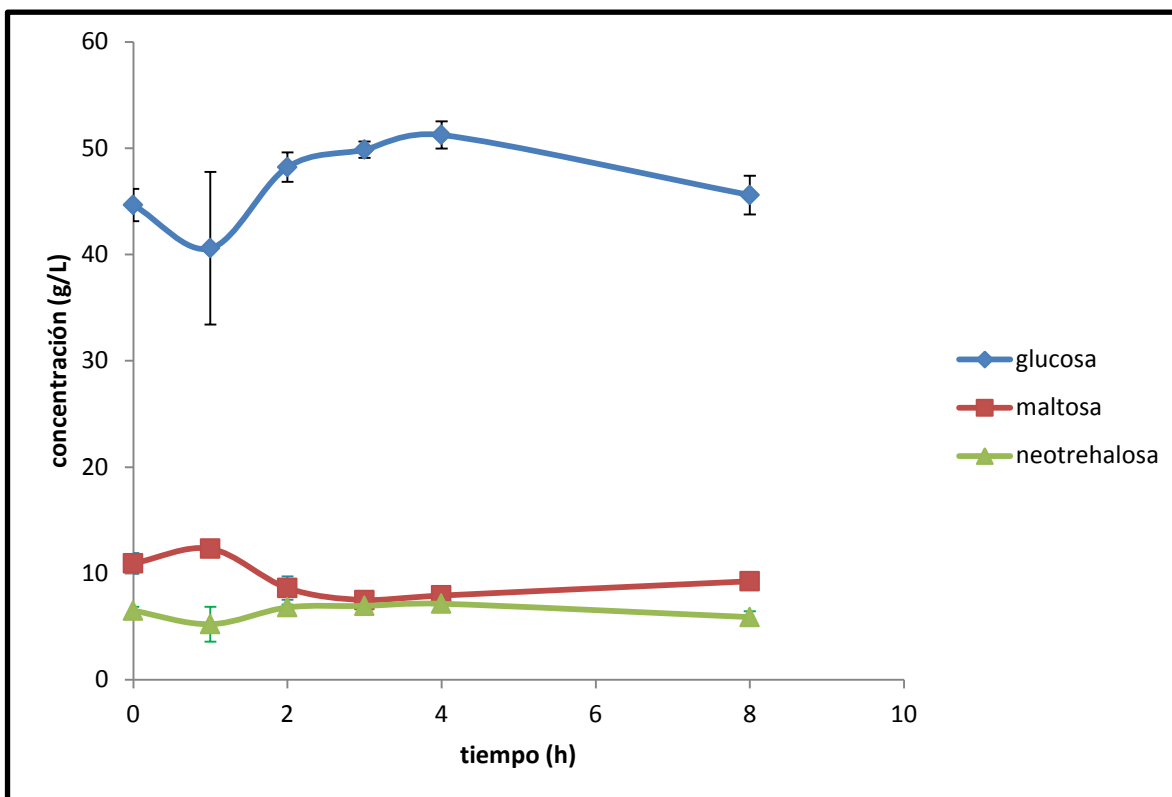


Figura 13. Variación de la composición de los productos de la reacción después de adicionar 10U/mL de AmyA al final de una reacción de síntesis (24h) como la descrita en la figura 12, El tiempo cero corresponde al tiempo de adición de la recarga de enzima.

El análisis de los resultados mostrados en la figura 12, se complementó con datos obtenidos de un análisis por cromatografía en capa fina de los primeros tiempos de reacción (Figura 14). Comparando ambos resultados se observa que la síntesis de neotrehalosa tiene lugar desde el inicio de la reacción. También resulta interesante constatar la presencia de subproductos de transglucosilación adicionales a las maltodextrinas, posiblemente con un núcleo de neotrehalosa, los cuales se señalan con una flecha roja. En todos estos casos, los productos con núcleo de neotrehalosa aparecen como una pequeña mancha inmediatamente después de la mancha intensa de los maltooligosacáridos, como se señala en la figura 14.

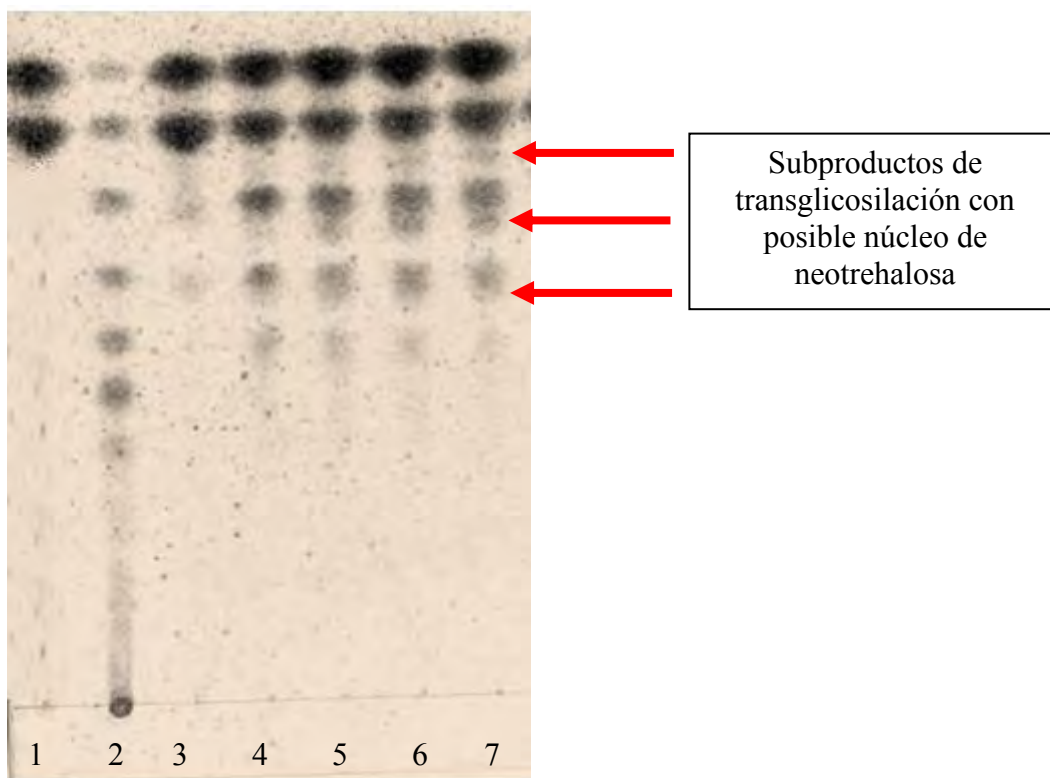


Figura 14. Cromatografía en capa fina de muestras la evolución de una reacción de AmyA 10U/mL empleando maltosa 60g/L, a pH=7 y 85°C. (1) estándares de glucosa y maltosa al 1% p/v, 2) estándar de maltodextrinas 1% p/v, Los carriles 3) al 7) corresponden a muestras tomadas a los 30 minutos, 1, 2, 8 y 28 horas de reacción respectivamente.

### 6.2.1. Digestión con glucoamilasa

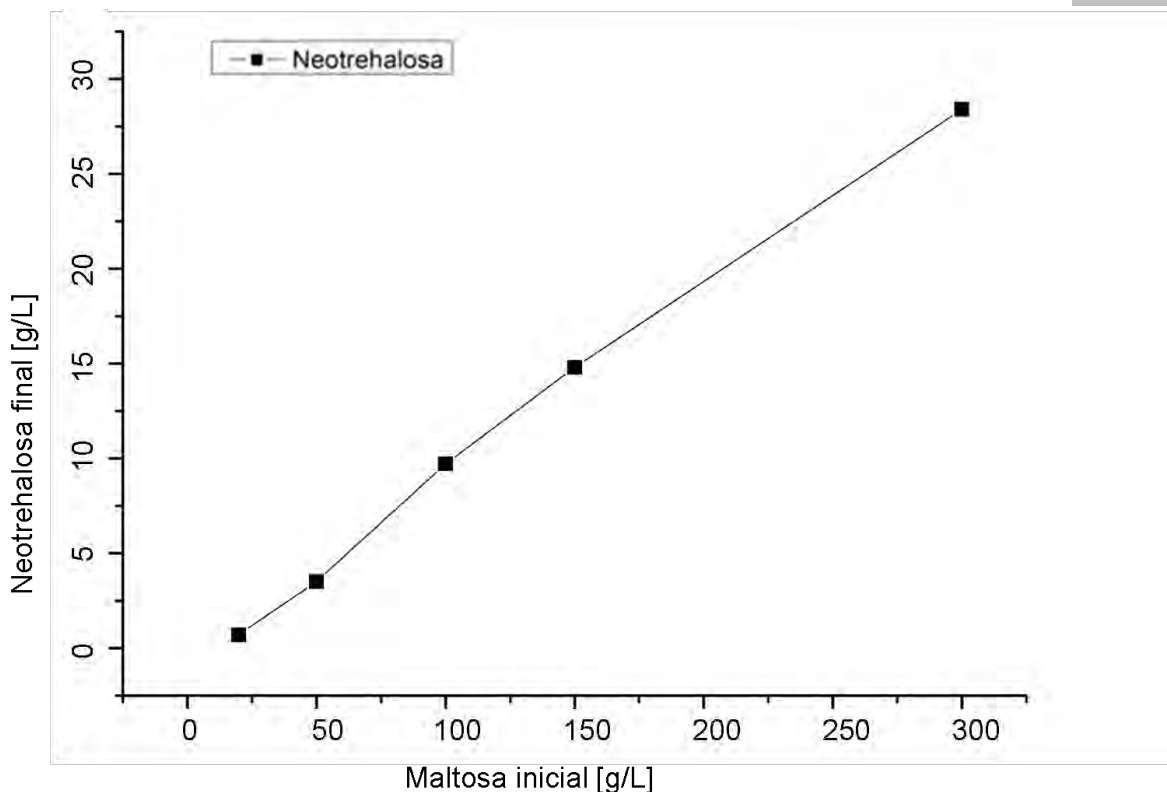
Como ya se ha mencionado, al final de la reacción persisten diferentes productos de transferencia adicionales a la neotrehalosa y a la maltosa, esencialmente compuestos de maltooligosacáridos pero que también incluyen oligosacáridos con núcleo de trehalosa, que pueden hidrolizarse mediante una reacción con glucoamilasa. Los resultados de este tratamiento se muestran en la tabla 4, en donde se aprecia que la digestión de estos subproductos libera neotrehalosa aumentando la cantidad observada después de la síntesis, lo que confirma de cierta manera que algunos de estos subproductos contienen el núcleo de neotrehalosa.

Tabla 4. Evolución del proceso de hidrólisis con glucoamilasa de los productos de una reacción de AmyA y maltosa, empleando la enzima glucoamilasa (0.8 U/ml) a pH=4.5, 50 C durante 240 minutos. .,

concentración en g/L				
Tiempo(min)	Glucosa	maltosa	neotrehalosa	Total
0	51.37	13.96	7.04	72.37
10	53.17	14.26	7.38	74.81
20	54.50	14.01	7.47	75.98
40	55.71	13.40	7.50	76.61
60	57.98	14.10	8.14	80.21
240	63.75	5.48	8.10	77.33

### 6.3. Efecto de la concentración de sustrato sobre la producción de neotrehalosa

Se realizó un estudio con el fin de observar el comportamiento de la reacción en función de la concentración de maltosa y así mejorar el rendimiento de síntesis de neotrehalosa.



**Figura 15.** Efecto de la concentración de maltosa en la reacción, en la concentración de neotrehalosa alcanzada al final de la reacción de síntesis con AmyA después de 24 horas de reacción y empleando 10 U/ml de enzima, en reacciones con un volumen total de 1ml. (pH= 7.0 y T =85°C).

En la figura 15 se puede observar que la cantidad de neotrehalosa (g/L) al final de la reacción aumenta de manera directamente proporcional al aumento en la concentración inicial de maltosa, de tal manera que es posible alcanzar, en este caso, hasta 30 g/L de neotrehalosa a la más alta concentración de maltosa analizada. Sin embargo en la definición de las condiciones de síntesis, habrá que tomar en cuenta que el rendimiento de la reacción alcanza un máximo a una concentración de sustrato de entre 100 y 150g/L como se muestra en la figura 16. De esta forma la selección de la concentración de maltosa para la reacción dependerá del costo de la maltosa, del costo de la neotrehalosa y del costo del proceso de separación de la neotrehalosa.

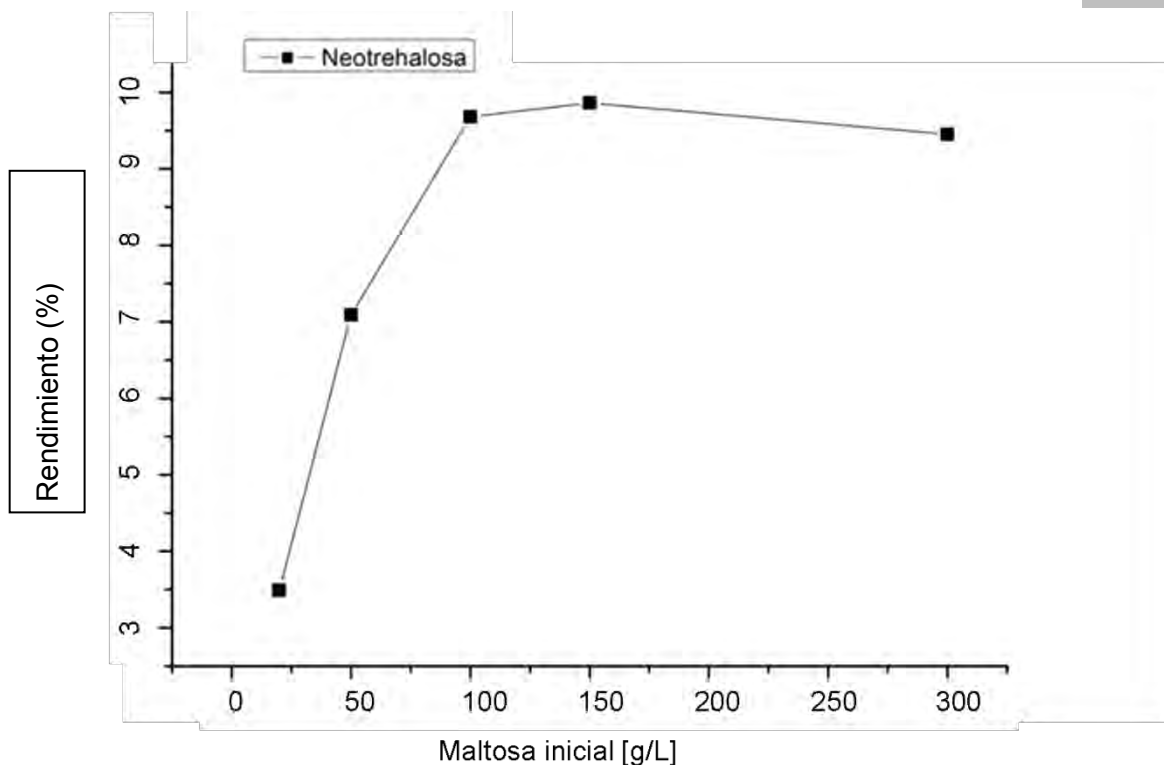
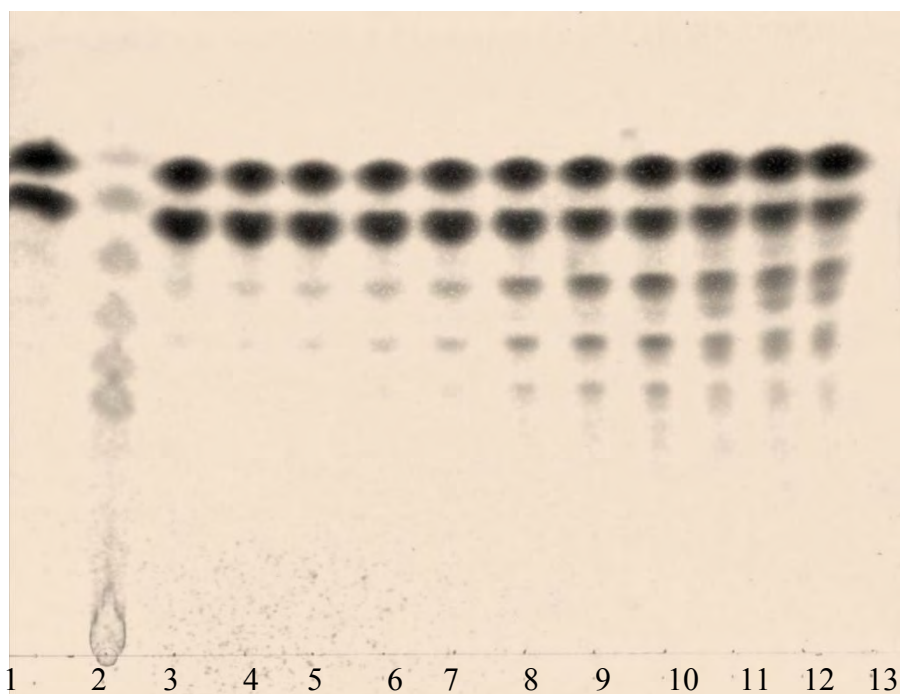


Figura 16. Rendimiento de la producción de neotrehalosa en función de la concentración de maltosa inicial. Las reacciones tuvieron un tiempo de duración de 24 horas, empleando 10 U/ml de enzima en un volumen de reacción de 1mL, (pH= 7.0 y T =85°C).

#### 6.4. Estudio de la producción de neotrehalosa a partir de maltosa y glucosa como sustrato.

Hemos elaborado algunas hipótesis que podrían explicar la síntesis de neotrehalosa durante la reacción de hidrólisis y transglucosilación de AmyA. Una de ellas consiste en que la glucosa derivada de la hidrólisis, actuó como aceptor de la glucosa vía la transferencia de una glucosa unida mediante un enlace  $\beta 1$  con la enzima (intermediario glicosil enzima) sobre el carbono  $\beta 1$  de una glucosa en solución. Con el fin de explorar la hipótesis se efectuó un experimento incluyendo glucosa (60 g/L) desde un principio en el medio de reacción, además de la maltosa (60 g/L) y esperando un efecto positivo en la síntesis de neotrehalosa con respecto al uso de maltosa o almidón, casos en los que, de ser válida la hipótesis, se requeriría de una primera etapa de formación de glucosa.

Como se observa en la figura 17, en presencia de glucosa se genera no solo el mismo perfil de productos que en una reacción empleando únicamente maltosa como sustrato, sino proporciones similares de neotrehalosa que en la reacción con maltosa exclusivamente (figura 13). Esto permite concluir que en la reacción no se requiere de glucosa libre (una hidrólisis previa de la maltosa) para iniciar la síntesis de neotrehalosa. Esta conclusión se confirmó al cuantificar la neotrehalosa presente en el medio al término de la reacción, obteniéndose un rendimiento cercano al 10% con respecto a la maltosa, como en los ensayos previos.



**Figura 17.** Evolución de la reacción de síntesis de neotrehalosa empleando como sustrato una mezcla de maltosa y glucosa al 60 g/L analizada mediante cromatografía de capa fina. Estándares de glucosa y maltosa al 1% p/v (carril 1), Estándar de maltodextrinas 2% p/v (carril 2), muestras tomadas a tiempos de reacción de 0, 3, 6, 12, 15, 30, 45 y 60 minutos (carriles 3 al 9), y muestras tomadas a las 2, 4 y 8 horas (carriles 10 al 13), (pH= 7.0 y T =85°C).

Aunque no se trata de resultados concluyentes relacionados con el mecanismo de la reacción, este resultado permite suponer que no se da una transferencia directa hacia la glucosa libre y apoya la hipótesis de que la transferencia del grupo glicosil se haga desde la enzima hacia el carbono  $\beta$ 1, ya sea de la maltosa o incluso de

otros oligosacáridos. Así, la maltosa es el sustrato clave, muy probablemente actuando como aceptor de grupo glicosilo, hipótesis que se ilustra mediante un esquema en la figura 18.

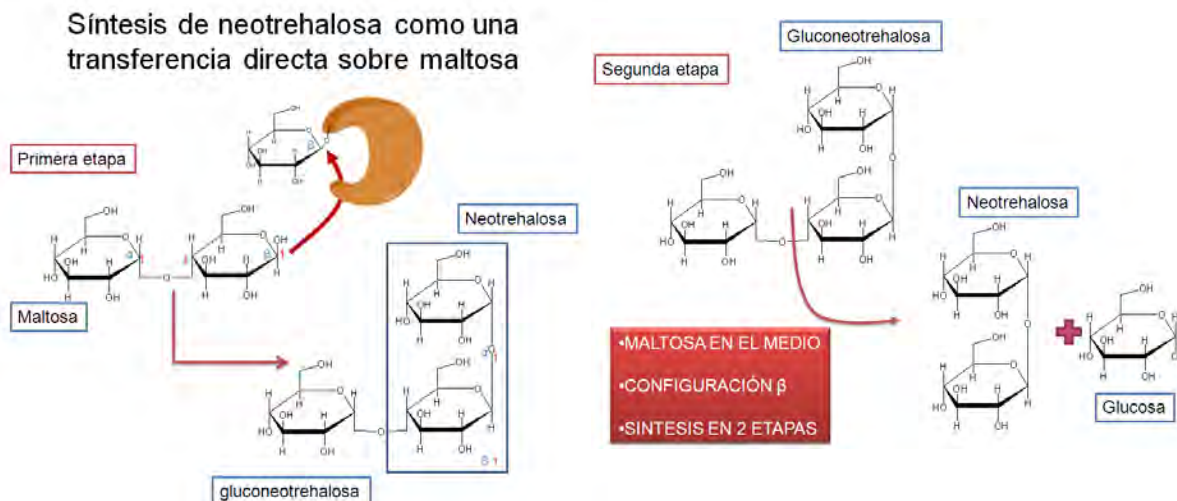


Figura 18. Esquema que ilustra un posible mecanismo de síntesis de neotrehalosa a partir de maltosa por AmyA. Se propone que la maltosa actúa como grupo aceptor de la glucosa transferida desde el intermediario glucosil-enzima dando lugar al enlace  $\alpha$ 1-  $\beta$ 1. El trisacárido formado sería posteriormente hidrolizado por la misma enzima para dar lugar a la trehalosa.

### 6.5. Estudio de reacciones de transglicosilación empleando p-nitrofenil-glucopiranosido como sustrato.

Se realizaron estudios empleando como sustrato al PNFG con el fin de contar con más evidencias para sustentar o no, la posibilidad de que la transferencia del grupo glucosilo para formar neotrehalosa se lleve a cabo sobre glucosa libre. Los resultados se muestran en la figura 19. Así, en presencia del p-nitrofenil glucopiranosido se esperaba observar una primera liberación de glucosa proveniente de la hidrólisis del PNFG para que después esta glucosa fuese empleada como grupo aceptor para dar lugar a la neotrehalosa vía la reacción de transferencia.

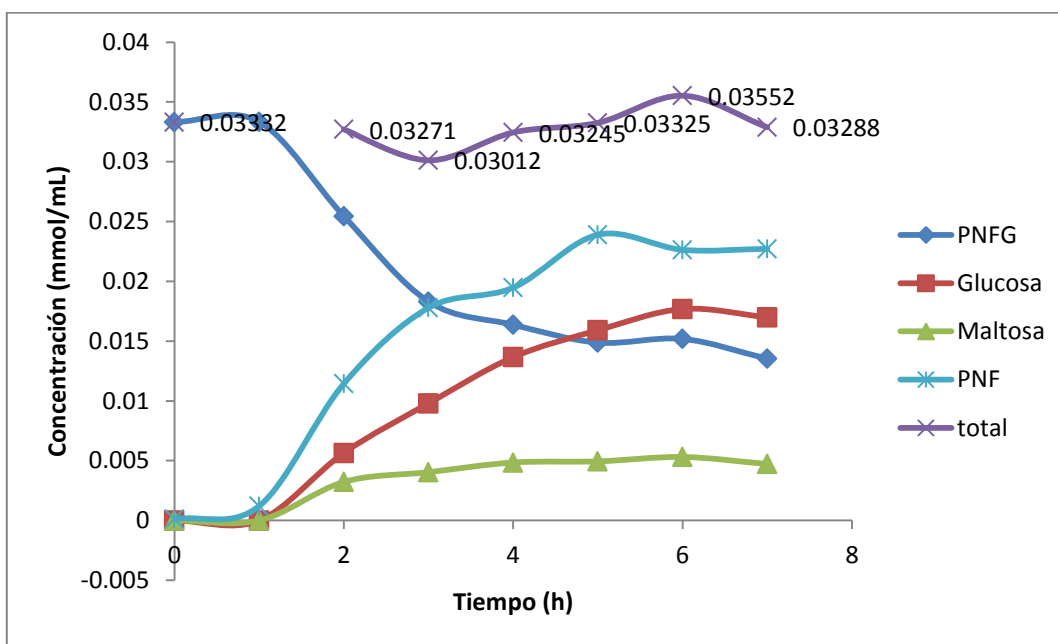


Figura 19. Evolución de una reacción con AmyA (10U/mL) empleando PNFG (1% p/v) como sustrato, (pH= 7.0 y T =85°C).

Como puede observarse en la figura 19, se encontró que desde los primeros momentos de la reacción se produce maltosa, lo que podría llevar a la conclusión de que la maltosa se genera por transferencia directa sobre glucosa; sin embargo, un análisis cuidadoso de los cromatogramas por HPLC en los que se muestra la evolución de los productos de la reacción, permite concluir que la maltosa se genera por transferencia directa de glucosa primero sobre el p-nitrofenil-glucopiranosido que actúa como donador y aceptor simultáneamente, dando lugar a un p-nitrofenil maltósido, que posteriormente es hidrolizado por la enzima para generar maltosa y liberar el p-nitrofenol. De forma análoga, cuando el sustrato es exclusivamente maltosa, esta puede actuar tanto como sustrato como aceptor, dando lugar preponderantemente a la maltotriosa y eventualmente –cuando la transferencia es en el otro extremo de la molécula, a la gluconeotrehalosa., De cualquier forma, este resultado aunado al anterior hacen evidente que la molécula aceptora necesitan ser dimérica: en el caso de la maltosa (dos moléculas de glucosa) y en el caso del p-nitrofenil-glucopiranosido el grupo agliconap-nitrofenol hace las veces de la segunda molécula de glucosa. Un esquema de cómo se



podría generar la maltosa a partir de p-nitrofenil-glucopiranosido se muestra en la figura 20.

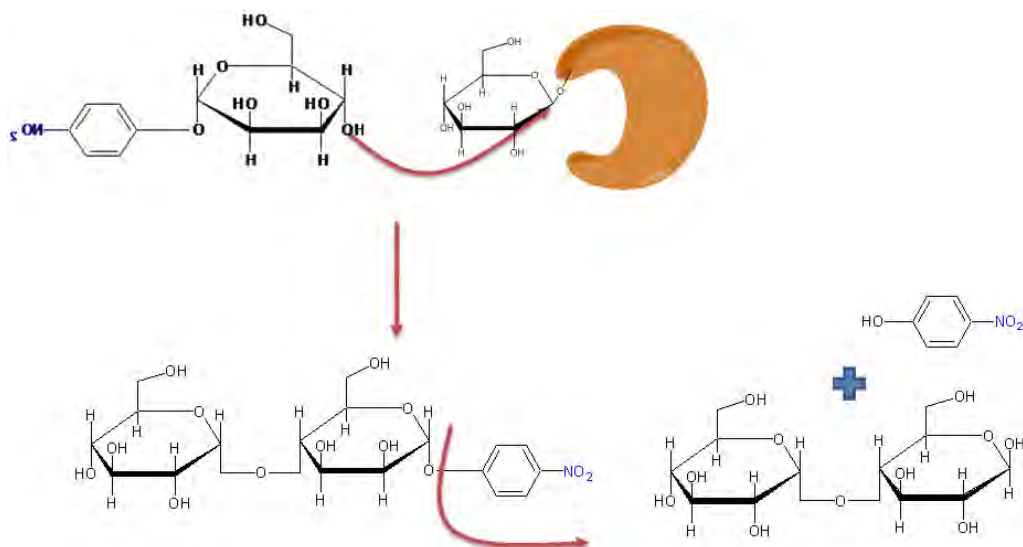


Figura 20. Esquema hipotético de la síntesis de maltosa a partir de p-nitrofenil-glucopiranosido

En conclusión, estos experimentos aunados a los anteriores, dan mayor validez a la hipótesis ilustrada en la figura 18.

### 6.6. Estudio de la síntesis de neotrehalosa a partir de almidón

Si bien la maltosa es un sustrato homogéneo, idóneo para la síntesis de compuestos de interés industrial, el almidón tendría la ventaja de una mayor disponibilidad y un menor costo. Así, con el fin de determinar si el almidón es un mejor sustrato para la producción de neotrehalosa que la maltosa también desde el punto de vista de la reacción, se llevaron a cabo reacciones con almidón de maíz (sigma) a concentraciones de 100g/L y en condiciones similares a las empleadas para la síntesis a partir de maltosa.

Estos resultados se muestran en la Figura 18, en la que puede observarse que

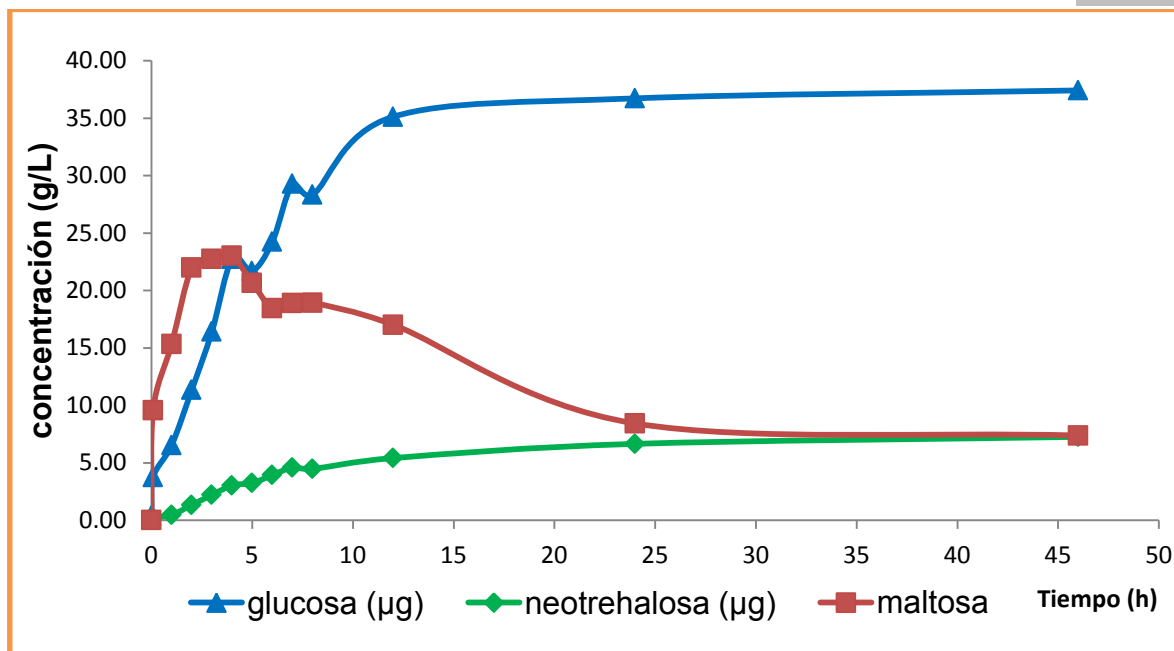


Figura 21. Síntesis de neotrehalosa en reacciones empleando 100 g/L de almidón a  $T=85^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=7$ , empleando 10U/ml de AmyA durante 48h.

el final de la reacción se alcanzó cerca de las 20 horas, esto es el doble del tiempo en comparación con maltosa. Resulta interesante observar que la síntesis de neotrehalosa coincide con la aparición de maltosa en el medio de reacción (Fig. 21), obviamente generada a partir de la hidrólisis del almidón. De cualquier forma, en esta reacción, se alcanzó una concentración final de neotrehalosa de 7.7 g/L, es decir, un rendimiento de 7.7% con respecto al almidón. La cuantificación de la neotrehalosa posterior a la hidrólisis con glucoamilasa de *A. niger*, tanto en el caso del almidón, como en el de la maltosa y por ende el rendimiento, no se vieron afectados significativamente después de la hidrólisis con glucoamilasa (no se muestran estos resultados).

En conclusión, de emplearse almidón, si bien se tendría la posibilidad de un sustrato de mayor disponibilidad y menor costo, la productividad disminuiría considerablemente en comparación con la maltosa, si tomamos en cuenta el tiempo requerido de reacción.

### 6.7. Comparación de la producción de neotrehalosa con las mutantes de AmyA H222Q y F281G

Con el fin de analizar si las mutantes de AmyA –dada su mayor actividad transferasa- también tienen una mayor producción de neotrehalosa que la enzima silvestre, se realizaron reacciones de síntesis comparativa con las tres enzimas. Como se puede apreciar en la tabla 5, desafortunadamente la producción de neotrehalosa por las enzimas mutantes en comparación con la enzima silvestre resultó ser menor, antes y después de la digestión con glucoamilasa. Se muestra así que a pesar de ser mutantes de AmyA con una demostrada actividad para la transferencia hacia alquilos, esta propiedad no parece estar asociada con la actividad transferasa global, o al menos la que da lugar a la neotrehalosa. En este sentido resulta interesante proponer la búsqueda y construcción de enzimas mutantes diseñadas de manera específica para aumentar la transferencia hacia la posición 1 más que a aumentar la transferencia en general.

**Tabla 5. Comparación de producción de neotrehalosa a partir de maltosa 10% y AmyA silvestre y mutantes respectivamente.**

Enzima	Rendimiento % con respecto a maltosa inicial	Rendimiento después de digestión con glucoamilasa
H222Q	2.30	2.52
F281G	7.57	7.64
Wt	8.14	8.60

### 6.8. Efecto de la concentración de maltosa sobre almidón y viceversa sobre la producción de neotrehalosa.

Si bien hasta este punto es claro que no hay una diferencia significativa entre el uso de almidón o de maltosa como sustratos, es evidente que el proceso de

síntesis de neotrehalosa en el caso del almidón, pasa por la producción de maltosa. Por esta razón, con el fin de analizar el efecto tanto de la concentración de maltosa y de almidón como de su proporción relativa en el medio de reacción sobre la síntesis de neotrehalosa se decidió llevar a cabo un diseño experimental del tipo 2<sup>2</sup>, a dos niveles de concentración de maltosa y almidón, 5 y 10% (p/v). Los resultados se muestran en la figura 22 en la que se puede observar que las interacciones del almidón sobre la maltosa a los dos niveles son paralelas lo que se interpreta como que no existe ninguna interacción de maltosa sobre almidón y viceversa, al menos a estos dos niveles.

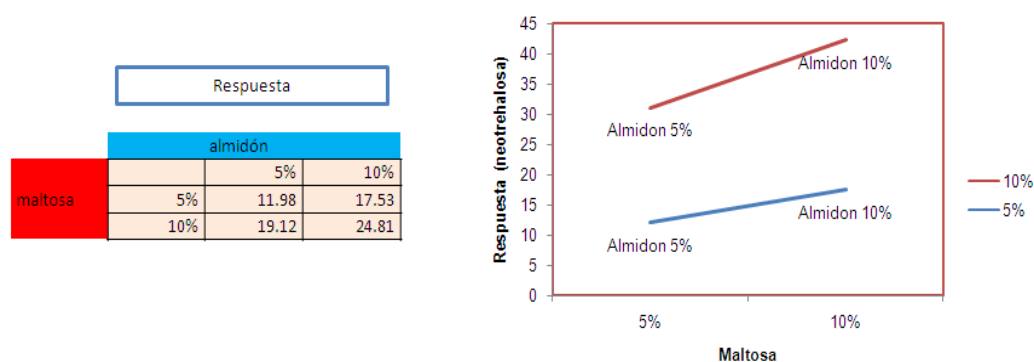


Figura 22. Análisis estadístico del efecto de la interacción entre sustratos (almidón y maltosa) a dos niveles en la síntesis de neotrehalosa.

Con el fin de determinar de manera específica el efecto de la concentración de estos dos sustratos sobre la producción de neotrehalosa, se realizaron diversos experimentos adicionales combinando ambos.

El perfil cinético de reacciones llevadas a cabo con 100 g/L de maltosa y 100 g/L de almidón simultáneamente como sustratos se presenta en la figura 23, en la que se reporta el consumo de maltosa y producción de glucosa y neotrehalosa. En esta figura se puede observar la caída de maltosa durante la primeras 2 horas seguida de un leve aumento de concentración de la misma alrededor de la cuarta hora debido a que AmyA también está actuando sobre el almidón cuyos productos principales de hidrólisis son maltosa y glucosa; con respecto a la síntesis de neotrehalosa esta se mantiene constante hasta alrededor de la decima hora.

Finalmente es importante mencionar que la reacción alcanza un estado de equilibrio cinético en tiempos similares a los observados con maltosa como sustrato exclusivo. En la tabla 6. se incluyen los resultados obtenidos para reacciones enzimáticas equivalentes, en las que el total de sustratos (200g/L) se aportó de manera exclusiva con maltosa o con almidón.

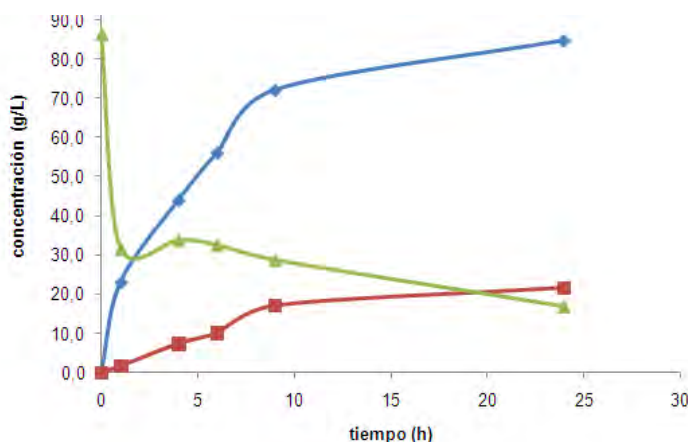


Figura 23. Evolución de la reacción de síntesis de neotrehalosa a partir de maltosa y almidón 100 g/L de almidón y maltosa a T=85°C, pH=7, empleando 10U/ml de AmyA.

Tabla 6. Rendimiento de neotrehalosa a partir de maltosa y almidón como sustrato de la reacción, en comparación a emplear estos mismos sustratos de manera separada.

Reacción (g/L)	Producción (g/L) Neotrehalosa	Rendimiento %	Total (neot+gluc+malt) (g/L)	Restante (g/L)
Maltosa 200	20,42	10,21	126,06	73,94
Almidón 200	17,38	8,69	102,84	97,46
Maltosa-almidón 100 c/u	23,2	11,6	123,2	76,8

Puede concluirse de los resultados anteriores, que usar la mezcla de maltosa/almidón trae como consecuencia un rendimiento ligeramente mayor en la síntesis de neotrehalosa con respecto a los controles de maltosa o almidón, aunque la conclusión más importante es que la producción se mantiene sin sufrir

cambios significativos en los tres casos por lo que cualquiera de las tres opciones es adecuada para producir neotrehalosa. Por otro lado, el tiempo de síntesis al emplear la combinación de los dos sustratos, es de aproximadamente 10 h, que comparado con el tiempo en el que se alcanzan niveles de neotrehalosa similares empleando almidón únicamente (20h), también resulta ventajoso.

#### 6.9. Síntesis de Lactoneotrehalosa a partir de lactosa y maltosa.

Considerando que el mecanismo principal de AmyA para hidrolizar y transferir es estéreo-específico sobre enlaces  $\alpha$ 1-4 (con las variantes al transferir en  $\alpha$ 1- $\beta$ 1), una estrategia adicional para la síntesis de neotrehalosa sería bloquear el carbono 4 para favorecer la transferencia al C1 del otro azúcar, En particular, en este experimento se propuso emplear un azúcar aceptor protegido en el hidroxilo 4 de la glucosa. Es el caso de la lactosa, que tiene a la galactosa bloqueando el carbono 4 de la glucosa por lo que de darse la reacción de transferencia sobre este aceptor esta se haría exclusivamente en el hidroxilo del carbono 1, como se esquematiza en la figura 24. Para tener una referencia, la misma reacción se llevó a cabo con la enzima CGTasa de *Thermoanaerobacter sp* con la que se ha demostrado que esta reacción sucede a partir de ciclodextrinas y lactosa, (Shibuya *et al.*, 1992).

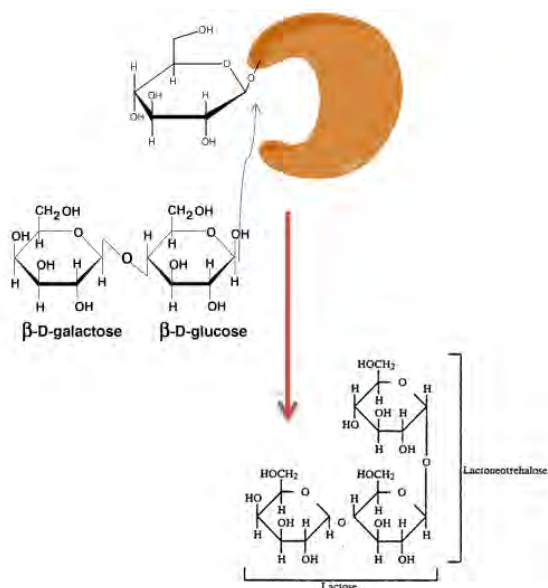


Figura 24. Esquema en el que se muestra la reacción de transferencia probable al emplear lactosa como aceptor de grupo glicosilo. Nótese que el hidroxilo del carbono 4 de la glucosa se encuentra bloqueado por la galactosa, de tal manera que la transferencia de la glucosa proveniente del complejo glucosil enzima, solo podría darse en la posición 1 generando el trisacárido lactoneotrehalosa.

En las figuras 25 y 26 se presentan las cromatoplasmas correspondientes a los productos de reacción de transferencia sobre lactosa, en reacciones en las que se emplearon lactosa como aceptor en ambas reacciones, maltosa como donador en el caso de AmyA y  $\beta$ -ciclodextrina como donador en el caso de la CGTasa. En estos resultados podemos observar la hidrólisis de los sustratos donadores por CGTasa y AmyA respectivamente en ausencia y presencia de aceptor (lactosa), generando tanto productos de hidrólisis como de transferencia entre los cuales se distingue la síntesis de lactoneotrehalosa.

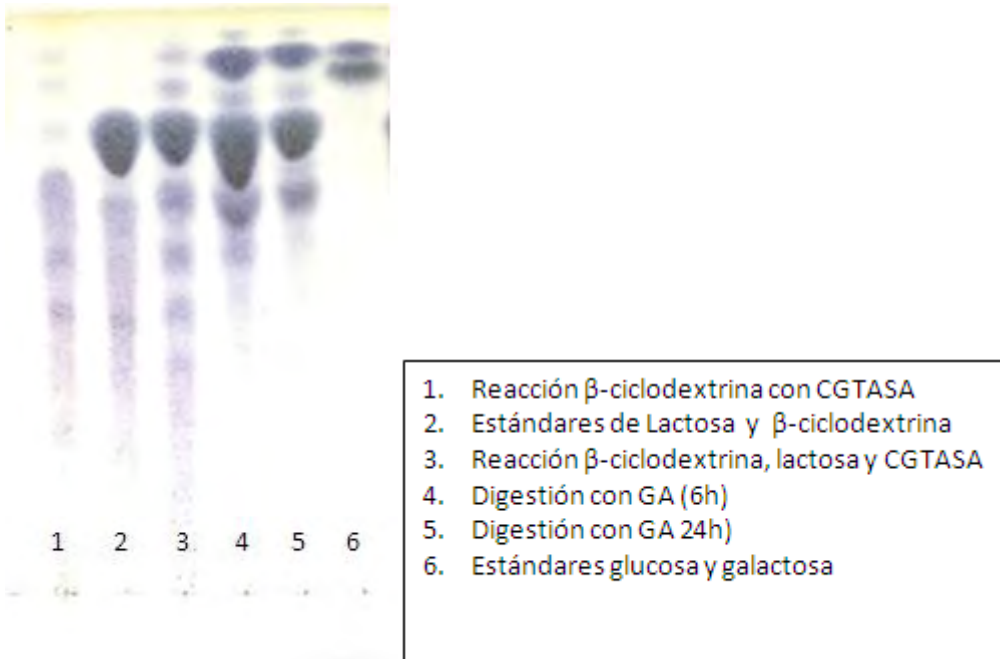


Figura 25. Cromatoplaqa de la síntesis de lactoneotrehalosa y otros oligosacáridos con CGTasa a partir de  $\beta$ -ciclodextrina y lactosa como aceptor (carril 3) así como la degradación de otros productos de transferencia diferentes a lactoneotrehalosa empleando glucoamilasa (carril 5).

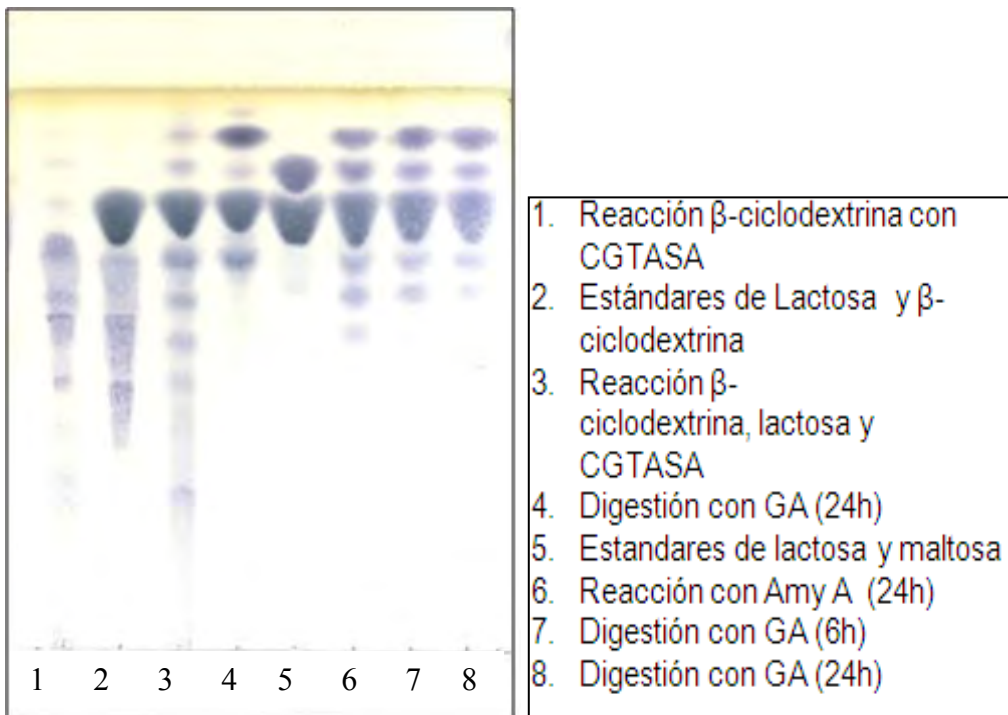


Figura 26. Cromatografía en capa fina de los productos de síntesis de lactoneotrehalosa en reacción con AmyA en presencia de lactosa como aceptor (carril 6) donde se observan productos de transferencia sobre lactosa los cuales no están presentes en el control (carril 2) y que se han eliminado para concentrar únicamente la lactoneotrehalosa (carril 8).



Se determinó la cantidad de lactoneotrehalosa sintetizada en las dos reacciones antes mencionadas mediante HPLC obteniéndose resultados que concuerdan con lo reportado en la literatura (figura 27); Sin embargo, los bajos niveles de síntesis no permitieron cuantificarlo. Un cromatograma de la reacción se muestra en la figura 28.

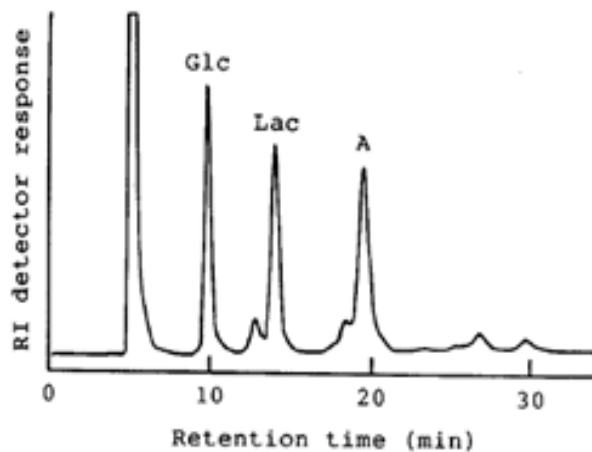


Figura 27. Cromatograma de la reacción de síntesis de lactoneotrehalosa después de hidrólisis con glucoamilasa, Glc, glucosa; Lac, lactosa; A, lactoneotrehalosa (Shibuya *et al.*, 1992).

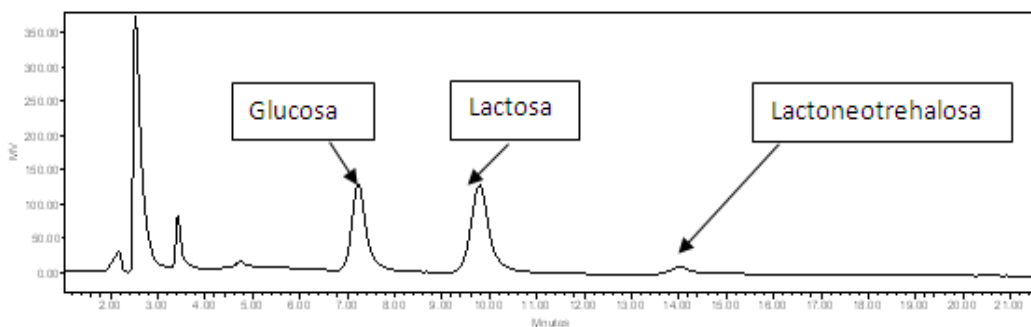


Figura 28. Perfil de HPLC de los productos de síntesis de lactoneotrehalosa por AmyA a partir de Lactosa y maltosa, se observa la glucosa liberada, lactosa remanente y lactoneotrehalosa sintetizada.

En conclusión, se encontró que si bien AmyA si lleva a cabo la transferencia sobre el hidroxilo del carbono 1 de la glucosa de la lactosa, para generar lactoneotrehalosa el rendimiento de esta reacción es muy bajo por lo que no es una buena estrategia para mejorar la síntesis de neotrehalosa.

#### 6.10. Síntesis de neotrehalosa a partir de maltosa en presencia de solventes.

Con el fin de analizar el efecto que tiene la disminución de disponibilidad de agua en el medio en la disminución de la actividad hidrolítica de la enzima, y a su vez el efecto que esto pudiera tener sobre la actividad transferasa en general y la síntesis de neotrehalosa en particular, se realizaron reacciones con AmyA en presencia de diferentes solventes. En primera instancia se midió el efecto del solvente en la estabilidad de la enzima, analizando el cambio de actividad al almacenarla en presencia del solvente. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 29, donde puede observarse que la actividad de AmyA sufre una caída de aproximadamente 10 veces la actividad en presencia de los cuatro solventes analizados.

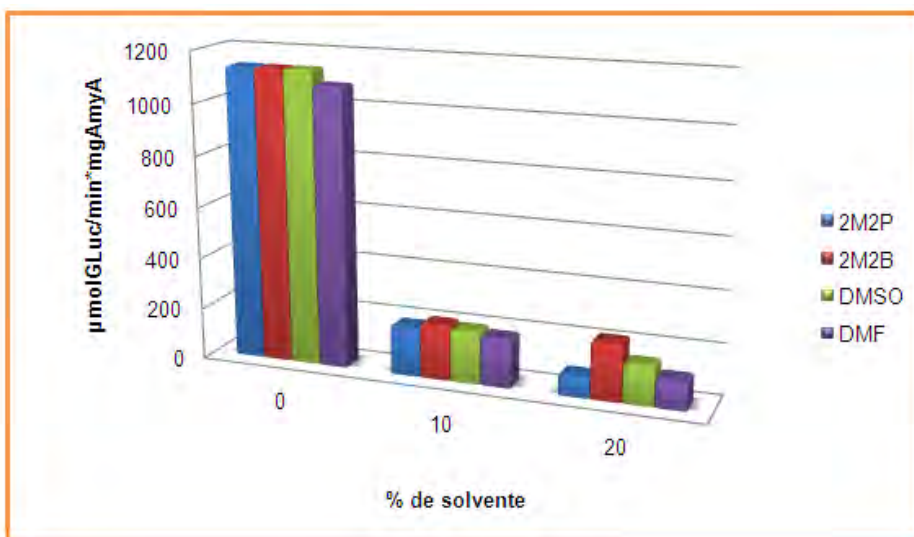
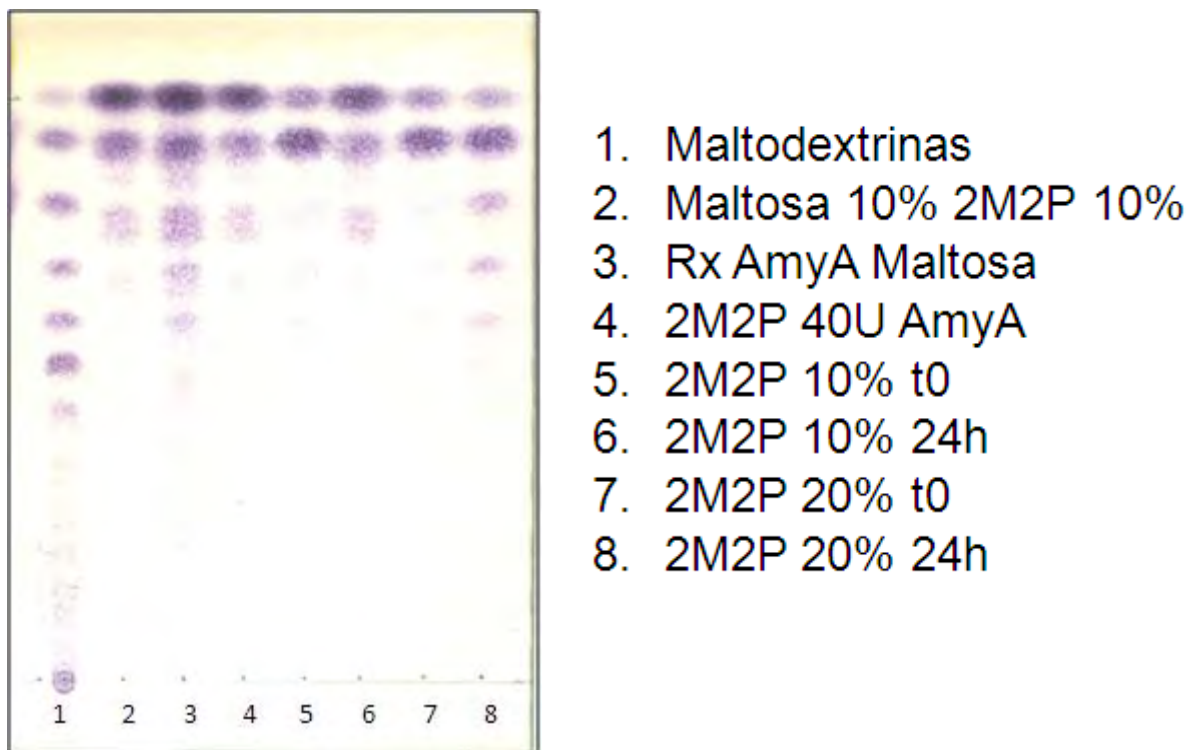


Figura 29. Efecto de diversos solventes en la actividad de la enzima AmyA, (Medición de azúcares reductores por DNS. Condiciones: Almidón 10g/L, T=85°C, pH=7.0 buffer TRIS, 10U AmyA, solventes (2M2P, 2M2B, DMSO y DMF)

A partir de los resultados anteriores, se decidió definir las condiciones de reacción semejantes a las empleadas anteriormente AmyA (10U/mL), T=85°C, pH=7, agregando al medio de reacción una proporción del solvente correspondiente de 10% v/v.

Dado el efecto negativo en la actividad por la presencia del solvente, en el control se agregaron 40 U/mL de AmyA para contender con la disminución de actividad y determinar si había un cambio en los productos finales de la reacción.

Los perfiles de productos fueron analizados por TLC como se muestra en la figura 30. En esta figura se aprecia un perfil de productos diferente al de la reacción de referencia (carril 3).



**Figura 30. Cromatoplaça de reacciones de síntesis De neotrehalosa por AmyA a partir de maltosa en presencia de solventes.**

En efecto, en todos los casos en los que se encuentra un solvente en el medio, la diferencia radica en la ausencia de productos de transferencia mayores a G4 los

cuales si se observan en la reacción de referencia, Este efecto podría ser muy importante puesto que tenemos una reacción más limpia para la síntesis de neotrehalosa; Finalmente la cuantificación de estas reacciones se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Rendimientos de producción de neotrehalosa en reacciones con AmyA a partir de maltosa y en presencia de solventes,  $\sigma = 0.3$  g/L. Condiciones de reacción: maltosa 100 g/L, pH=7.0, T=85°C, 10 U/mL AmyA, tiempo Rx= 24h, Solvente 10% v/v**

Solvente	Neotrehalosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Glucosa (g/L)	G+M+N (g/L)	Rendimiento %
<b>DMSO</b>	11,6	11,01	53,07	75.6	11,6
<b>DMF</b>	11,6	13,04	50.10	74.7	11,6
<b>2M2P</b>	12.1	14,41	48,74	75.2	12.1
<b>2M2B</b>	11.7	13,50	48,76	73.9	11.7
-----	10.3	12.97	50.24	73.51	10.3

Analizando los resultados mostrados en la tabla 7 se observa que aunque limitado, existe un leve aumento en el rendimiento de síntesis de neotrehalosa en presencia de solvente, en particular 2M2P, que lleva la reacción hasta 12.1 g/L comparada con 10.3 g/L en ausencia de solvente, probablemente debido a que la transferencia (origen de la neotrehalosa) se lleva a cabo de una manera más controlada dado que no se producen oligosacáridos de alto peso molecular.

Reflexiones finales.

Los resultados anteriores si bien no son totalmente concluyentes, si nos permiten especular sobre el hecho de que la evolución de la reacción de síntesis de neotrehalosa no es afectado por la presencia de glucosa, por lo que se descarta como sustrato aceptor para la formación directa de neotrehalosa; en contraste los resultados obtenidos a partir de almidón y maltosa, solos o en combinación, sugieren que la maltosa es el sustrato clave en la producción de neotrehalosa. Esto en parte debido al hecho de que en presencia de almidón como sustrato, la aparición de neotrehalosa requiere de la producción previa de maltosa.

Asimismo, y de manera indirecta, el experimento con PNFG donde se encuentran como productos de la reacción maltosa y glucosa, en comparación con los experimentos en los que se emplea glucosa libre como sustrato (datos no mostrados), reacción en la cual no se encontraron productos, nos sugiere que el mecanismo de AmyA requiere de un compuesto bimolecular para poder catalizar reacciones de transferencia que den lugar a la neotrehalosa, en este caso PNFG o maltosa.

Por otro lado la neotrehalosa es dependiente de la transferencia seguida de una hidrólisis, por lo que se planteó utilizar solventes en el medio, con el fin de aumentar la relación transferencia/hidrólisis y así aumentar la producción de neotrehalosa. Sin embargo se encontró que la síntesis de neotrehalosa se mantenía en los niveles de producción ya alcanzados en ausencia de solventes. Este resultado aunado con el experimento de transferencia únicamente sobre el hidroxilo del carbono 1 de la glucosa de la lactosa, (el único disponible) en el cual no se encontró una transferencia importante sobre la posición 1, al menos, insuficiente para su cuantificación, nos llevan a concluir que la transferencia sobre esta posición catalizada por AmyA es poco eficiente.

## 7. CONCLUSIONES

La síntesis de neotrehalosa por AmyA se realiza a partir de cualquier sustrato de la enzima, vía la transferencia de glucosa a la glucosa reductora de un oligosacárido, para dar lugar a un enlace del tipo  $\alpha 1$ -  $\beta 1$ , siempre en competencia desfavorable contra la transferencia en  $\alpha 1$ -4. El oligosacárido más eficiente es la maltosa –dando lugar a un trisacárido que es posteriormente hidrolizado a trehalosa- aunque se demostró que existe neotrehalosa en otros productos de la reacción de mayor peso molecular al hidrolizarlos con glucoamilasa. Estos productos pueden venir de la transferencia en  $\alpha 1$ -4 de un oligosacárido que ya tiene un núcleo de trehalosa, o bien una transferencia en  $\alpha 1$ -  $\beta 1$  a uno que no lo tiene, como en el caso de la maltosa. Sin embargo, no se obtuvieron resultados interesantes al bloquear la posibilidad de transferencia en  $\alpha 1$ -4 de un aceptor (caso de la lactosa). : Tampoco se observó capacidad de transferencia directa a la glucosa como aceptor. Una posibilidad que queda abierta es tratar de modificar la eficiencia de la reacción a través de una mayor disponibilidad de glucosa o maltosa en el medio como grupo aceptor en la configuración anomérica  $\beta$  del carbono reductor, ya que esto en principio debería favorecer la eficiencia de la reacción. En este sentido, se lograron aumentos en el rendimiento con un máximo promedio del 10% con respecto a maltosa, en concentraciones de 100g/L, pero concentraciones hasta de 30g/L empleando 300 g/L de maltosa.

No se encontraron ventajas al limitar la hidrólisis durante la reacción mediante la presencia de solventes, aunque si se modificó el perfil de productos de la reacción.

La información recabada nos permite plantear una metodología de síntesis de neotrehalosa de acuerdo a nuestras necesidades, ya sea a partir de un sustrato accesible desde el punto de vista económico (almidón) o bien un menor tiempo de

producción y medios de reacción más limpios (maltosa); de la misma forma, una reacción con menos subproductos en comparación con la maltosa mediante el empleo de solventes en el medio. Los productos finales de síntesis de neotrehalosa en presencia de solventes son principalmente glucosa, maltosa, neotrehalosa y maltotriosa, en contraste con un medio libre de solventes en el cual la mezcla final de productos es más compleja en donde se producen oligosacáridos de mayor peso molecular como la maltopentaosa.

La distribución final de productos parece estar definida por un equilibrio en el que intervienen por un lado la síntesis de oligosacáridos mediante reacción inversa y transglicosidación y por el otro la hidrólisis. Aunque esta conclusión no fue contundentemente demostrada. Sin embargo si se demostró que la distribución final de productos no se debe a desactivación de la enzima al final de la reacción.

La actividad transferasa que lleva a la transferencia de glucosa a alcoholes, no está relacionada con la capacidad de AmyA para sinterizar neotrehalosa. Al menos no desde la perspectiva del uso de mutantes con mayor capacidad para la alcoholisis, que no resultaron mejores productoras del disacárido.

## 8. PERSPECTIVAS

Se lograron avances en el conocimiento sobre el comportamiento cinético de la enzima AmyA en lo que a la producción de neotrehalosa se refiere. Sin embargo existen aun diversas incógnitas para poder hacer una propuesta más racional que permita alcanzar el objetivo de producir eficiente de neotrehalosa. Buena parte de estos elementos se refieren a la forma de modificar la especificidad de la enzima para favorecer las transferencias sobre hidroxilos de C1 de la glucosa sobre el C4, así como de encontrar el aceptor idóneo. Esta posibilidad conlleva la necesidad de adentrarse dentro de la estructura de la enzima y la relación estructura función.

De igual forma, la manipulación de la disponibilidad de agua en el medio de reacción mediante el uso de solventes es una herramienta apenas explorada en este trabajo, que promete resultados interesantes no solo en el contexto de la trehalosa, sino también de la definición del perfil de productos al limitar la hidrólisis.

Determinar por métodos computacionales si es posible relacionar las mutaciones sobre AmyA con el aumento o decremento de la producción de neotrehalosa, estudio centrado en aumentar la estéreo-especificidad de AmyA sobre enlaces 1-1.



## 9. BIBLIOGRAFIA

- Davies, G. and B. Henrissat (1995). "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." 3(9): 853-859.
- Hajie Aga, e. a. (Aug. 12, 1997 ). Non reducing oligosaccharide with neotrehalose structure, its production and uses. Japan, Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo (Okayama, JP)
- Janecek, S. (1997). "[alpha]-amylase family: Molecular biology and evolution." Progress in Biophysics and Molecular Biology 67(1): 67-97.
- Juanita Yazmin Damián-Almazo, A. M., Agustín López-Munguía, Xavier Soberón, Fernando González-Munóz, and Gloria Saab-Rincón (2008). "Enhancement of the Alcoholic Activity of  $\alpha$ -Amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by Site-Directed Mutagenesis " Applied and environmental microbiology.: 5168–5177.
- Liebl, W., Semplinger I., Ruile O. (1997). "Properties and Gene Structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a Putative Lipoprotein of a Hiperthermophilic Bacterium." J. Bacteriol 179(3): 941-948.
- MacGregor, E. A., S. Janecek, et al. (2001). "Relationship of sequence and structure to specificity in the [alpha]-amylase family of enzymes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology 1546(1): 1-20.
- Mariano García Garibay, R. Q. R., Agustín López Munguía (2002). Biotecnología alimentaria. México, Limusa, Noriega editores.
- Matsuda, e. a. (1959). "Studies on the Disaccharides in Koji extract and Sake. Part IV. Isolation and Identification of  $\alpha$ - $\alpha$ -and  $\alpha$ - $\beta$  Trehalose." Nippon Nogeikagaku Kaishi: 11 9-1 23.
- Miwa, e. a. (Apr. 4, 1995). Process for preparing neotrehalose and its uses Japan. 5,403,727.

- Alina, M., Juanita Yazmin, D-A., Alfonso, M., Gloria, S-R., Fernando, G., Agustin, L.-M.  
Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase  
(2010) *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (5), pp. 331-337.
- Moreno, A., J. Y. Damian-Almazo, et al. "Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* [alpha]-amylase." *Enzyme and Microbial Technology* 46(5): 331-337.
- Nikolov, e. a. (1989). "Kinetics, Equilibria, and Modeling of the Formation of Oligosaccharides from D-Glucose with *Aspergillus niger* Glucoamylases I and II  
" *Biotechnology and Bioengineering* 34: 694-704.
- Rye, C. S. and S. G. Withers (2000). "Glycosidase mechanisms." *Current Opinion in Chemical Biology* 4(5): 573-580.
- Swallow, K. W.; Low, N. H., Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990, 38, 1828-1832.
- Schumann J., W. A., Jaenicke R., Stetter (1991). "Topographical and enzymatic characterization of  
amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*  
" *FEBS Letters*  
1: 122-126.
- Shibuya, e. a. (November 26, 1996). Process for preparing neotrehalose, and its uses. Japan, Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo (Okayama, JP)
- Sinnott, M. L. (1990). "Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer." *Chemical Reviews* 90(7): 1171-1202.
- Siró, I., E. Kápolna, et al. (2008). "Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--A review." *Appetite* 51(3): 456-467.
- Zhang, Z., S. Sugio, et al. (1994). "Crystal structure of recombinant chicken triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex at 1.8-Å resolution." *Biochemistry* 33(10): 2830-2837.

